



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Patogenicidad de una cepa móvil de *Yersinia ruckeri*  
procedente de Huaraz en trucha arcoíris  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Fernando Daniel MESÍAS VALLE**

**ASESOR**

**Nieves Nancy SANDOVAL CHAUPE**

**Lima, Perú**

**2017**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Mesías F. Patogenicidad de una cepa móvil de *Yersinia ruckeri* procedente de Huaraz en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) [Tesis de pregrado]. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.

---



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día viernes **15 de diciembre de 2017**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0234-EPMV/FMV-2017**, integrado por los siguientes profesores:

<b>SIEVER MIGUEL MORALES CAUTI</b>	Presidente del Jurado
<b>NIEVES NANCY SANDOVAL CHAUPE</b>	Asesor de la Tesis
<b>WILLIAM ARTHUR BARRIOS SANTOS</b>	Miembro del Jurado
<b>LUIS CERRO TEMOCHE</b>	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **MESÍAS VALLE, FERNANDO DANIEL** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“PATOGENICIDAD DE UNA CEPA MÓVIL DE *Yersinia ruckeri* PROCEDENTE DE HUARAZ EN TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)”**,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Siever Miguel Morales Cauti: MV. Mg. Prof. Asociado, T.C.

Nieves Sandoval Chaupe: MV. Mg. Prof. Principal, D.E.

William Arthur Barrios Santos: MV. Mg. Prof. Auxiliar T.C.

Luis Cerro Temoche: MV. Dr. Prof. Contratado, T.C.





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0234-EPMV/FMV-2017.

PRESIDENTE:

.....  
SIEVER MIGUEL MORALES CAUTI

MIEMBROS :

.....  
NIEVES NANCY SANDOVAL CHAUPE  
Asesor de la Tesis

.....  
WILLIAM ARTHUR BARRIOS SANTOS

.....  
LUIS CERRO TEMOCHE

San Borja, 09 de noviembre de 2018

Vº Bº

.....  
Dra. Daphne Ramos Delgado  
Directora  
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

## **AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo de la Sección de Ictiopatología. Por ello, agradezco a mi estimada asesora, Dra. Nieves Sandoval Chaupe, mis compañeros de equipo Alex Cueva y Mario Vargas, quienes a lo largo del desarrollo del camino pusieron a prueba sus capacidades y conocimientos en la realización de la presente tesis, la cual fue el inicio de un gran proyecto. Finalmente, un eterno agradecimiento a mis demás amigos y compañeros, que de alguna forma u otra me ayudaron con la elaboración de la presente tesis.

## **DEDICATORIA**

La realización de estas tesis está dedicada a mi madre y mi padre, pilares fundamentales en mi vida diaria. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora soy y tengo. Su tenacidad y lucha insaciable, han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar para mí. También, dedico este proyecto a mi enamorada, amiga y compañera que representó gran esfuerzo y tesón en momentos de decline y cansancio. A ellos dedico este proyecto, que sin ellos, no hubiese podido ser.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	xii
LISTA DE SIGLAS .....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 Situación actual de la acuicultura .....	2
2.1.1 Acuicultura. ....	2
2.1.2 Acuicultura mundial. ....	2
2.1.3 Acuicultura nacional.....	5
2.1.4 Producción nacional de trucha. ....	6
2.2 Trucha arcoíris .....	7
2.2.1 Clasificación taxonómica. ....	8
2.2.2 Características generales y biológicas. ....	8
2.2.3 Etapas de desarrollo.....	9
2.2.4 Tipos de crianza.....	10
2.2.5 Parámetros del recurso hídrico para el cultivo. ....	10
2.3 <i>Yersinia ruckeri</i> .....	10
2.3.1 Identificación y clasificación. ....	10
2.3.2 Factores de virulencia. ....	12
2.4 Enfermedad de la Boca Roja o Yersiniosis.....	15
2.4.1 Hospedero y distribución. ....	15
2.4.2 Transmisión y epidemiología. ....	16
2.4.3 Ruta de entrada y diseminación. ....	17
2.4.4 Respuesta inmune de los peces. ....	18
2.4.5 Signos clínicos.....	18
2.4.6 Hallazgos histopatológicos. ....	20
2.4.7 Diagnóstico.....	21
2.4.8 Control y Prevención. ....	22
III. METODOLOGÍA .....	25
3.1 Tipo y lugar de estudio .....	25
3.2 Animales de estudio .....	25



3.3 Condiciones de crianza .....	26
3.4 Cepa desafío y preparación del inóculo.....	27
3.5 Diseño experimental .....	27
3.6 Evaluación de patogenicidad.....	28
3.7 Aislamiento e identificación de <i>Y. ruckeri</i> .....	28
3.8 Estudio histopatológico.....	28
3.9 Consideraciones éticas .....	29
3.10 Análisis de datos de las lesiones histopatológicas .....	29
IV. RESULTADOS.....	30
4.1 Signos clínicos y lesiones externas e internas .....	30
4.2 Mortalidades .....	30
4.3 Confirmación mediante PCR .....	33
4.4 Lesiones histopatológicas.....	33
V. DISCUSIÓN .....	50
VI. CONCLUSIONES .....	54
VII. REFERENCIAS .....	55
VIII. ANEXOS.....	67

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la patogenicidad de una cepa motil de *Y. ruckeri* procedente de Huaraz y caracterizar histológicamente las lesiones halladas en diversos órganos de alevines de trucha arcoíris. Para ello, se utilizó 100 alevines con un peso promedio de 7.25 g, divididos en 5 grupos de 20 individuos (cuatro experimentales y un control), mantenidos en estanques de 30 litros. Los peces fueron inoculados por vía intramuscular 0,1 ml de la cepa de *Y. ruckeri* a diversas concentraciones:  $1 \times 10^4$ /ml para el grupo 1 (G1),  $4 \times 10^4$ /ml para el grupo 2 (G2),  $1 \times 10^8$ /ml para el grupo 3 (G3),  $4 \times 10^8$ /ml para el grupo 4 (G4) y el grupo control con PBS. Se realizó un monitoreo diario por 12 días, registrándose signos clínicos, lesiones externas e internas (en muertos), morbilidad y mortalidad. Los peces moribundos se anestesiaron con eugenol (3 ml/l), luego se les realizó corte medular y posterior necropsia según Meyers (2009). Para comprobar que los peces sólo eran afectados por *Y. ruckeri* inoculada, se realizó el aislamiento bacteriano de muestras de bazo y riñón, los cuales fueron cultivados en agar tripticasa de soya por 24-48 horas a 25°C, observándose crecimiento de colonias bacterianas con características bioquímicas a *Y. ruckeri*, siendo confirmadas posteriormente por PCR convencional. Así mismo, se colectaron muestras de intestino, bazo, riñón, hígado, músculo y branquias para el análisis histopatológico. Todos los peces inoculados con *Y. ruckeri* presentaron signos y lesiones compatibles con yersiniosis; registrándose inapetencia (95%) y melanosis (76%) como los signos más frecuentes, los cuales aparecieron a las 12 horas post inoculación en los grupos G3 y G4, y al 3° día post inoculación (dpi) para los grupos G1 y G2. Entre las lesiones más importantes se observó esplenomegalia (84%), contenido mucoso en intestino (80%) y congestión intestinal (60%). Adicionalmente se determinó una mortalidad de 100% para los grupos G3 y G4, la cual empezó al 2° dpi para ambos; y mortalidades de 65 y 60% para los grupos G1 y G2, respectivamente, las cuales iniciaron al 7° dpi para ambos. A nivel histopatológico, los órganos más afectados fueron intestino con: evidente necrosis, hiperplasia de enterocitos y células mucosas, y presencia de bacterias; el bazo presentaba: congestión, presencia de melanomacrófagos y bacterias, extravasación de glóbulos rojos y disminución linfoide; y el músculo con: necrosis, y presencia de bacterias y melanomacrófagos. En conclusión, la cepa mótil de *Yersinia ruckeri* procedente de Huaraz es patógena, produciendo mortalidad y diversas lesiones en tejidos de truchas arcoíris según su concentración en condiciones experimentales. Las concentraciones de  $1 \times 10^8$  y  $4 \times 10^8$  de *Y. ruckeri* produjeron los más altos índices de patogenicidad; sin embargo, concentraciones tan bajas, como  $1 \times 10^4$  y  $4 \times 10^4$  de *Y. ruckeri*, confirman la patogenicidad de esta cepa bacteriana; ya que ocasionaron mortalidades y lesiones anátomo-patológicas significativas en truchas arcoíris, tal como se describen en infecciones naturales.

**Palabras claves:** *Yersinia ruckeri*, trucha arcoíris, patogenicidad, enfermedad de la boca roja

## ABSTRACT

The objective of this study was to determine pathogenicity of a motile strain of *Y. ruckeri* from Huaraz and to characterize histologically the lesions found in the organs of rainbow trout fry. For this, 100 fingerlings with an average weight of 7.25 g were used, divided into 5 groups of 20 individuals (four experimental and one control), kept in 30 liter tanks. Fishes were inoculated intramuscularly 0.1 ml of the *Y. ruckeri* strain at varied concentrations:  $1 \times 10^4$  /ml for group 1 (G1),  $4 \times 10^4$  /ml for group 2 (G2),  $1 \times 10^8$  /ml for the group 3 (G3),  $4 \times 10^8$  /ml for group 4 (G4) and control group with PBS. A daily monitoring was performed for 12 days, registering clinical signs, external and internal injuries, morbidity and mortality. Moribund fish were anesthetized with eugenol (3 ml /l), then they underwent spinal cord cutting and subsequent necropsy were performed according to Meyers (2009). To verify that fishes were affected by *Y. ruckeri* inoculated, bacterial isolation of spleen and kidney samples was performed, cultures were on trypticase soy agar for 24-48 hours at 25°C, observing only growth of bacterial colonies with *Y. ruckeri* biochemical characteristics, PCR was subsequently carried out confirming the inoculated strain and no other bacteria. Likewise, samples of intestine, spleen, kidney, liver, muscle and gills were collected for histopathological analysis. All fish inoculated with *Y. ruckeri* presenting signs and lesions compatible with yersiniosis; inappetence (95%) and melanosis (76%) were recorded as the most frequent signs, which appeared at 12 hours post inoculation in groups G3 and G4, and on day 3 post inoculation (dpi) for groups G1 and G2 . Among the most important lesions were splenomegaly (84%), mucous content in the intestine (80%) and intestinal congestion (60%). Additionally, a 100% mortality was determined for groups G3 and G4, which started at 2 ° dpi for both; and mortalities of 65 and 60% for groups G1 and G2, respectively, which started at 7 ° dpi for both. At histopathological level, the most affected organs were intestine with: evident necrosis, hyperplasia of enterocytes and mucous cells, and the presence of bacteria; spleen showed: congestion, presence of melanomacrophages and bacteria, extravasation of red blood cells and lymphoid decrease; and muscle with: necrosis, and presence of bacteria and melanomacrophages. In conclusion, *Yersinia ruckeri* strain from Huaraz is pathogenic, producing mortality and various lesions in rainbow trout tissues according to their concentration under experimental conditions. The  $1 \times 10^8$  and  $4 \times 10^8$  concentrations of *Y. ruckeri* produced the highest rates of pathogenicity; however, such low concentrations, such as  $1 \times 10^4$  and  $4 \times 10^4$  of *Y. ruckeri*, confirm the pathogenicity of this bacterial strain; since they caused deaths and pathological lesions in rainbow trout, as described in natural infections.

**Key Words:** *Yersinia ruckeri*, rainbow trout, pathogenicity, red mouth disease

## LISTA DE FIGURAS

*Figura 1.* Producción mundial de la pesca y la acuicultura, FAO, 1950-2014

*Figura 2.* Ejemplar típico de Trucha arcoíris

*Figura 3.* Amplificación de PCR por electroforesis de aislados de *Y. ruckeri*, 2015

*Figura 4.* Cortes histológicos de hígado de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*

*Figura 5.* Cortes histológicos de bazo de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*

*Figura 6.* Cortes histológicos de riñón de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*

*Figura 7.* Cortes histológicos de intestino de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*

*Figura 8.* Cortes histológicos de músculo de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*

*Figura 9.* Cortes histológicos de branquias de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*.

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. *Producción de los principales grupos de especies comestibles procedentes de la acuicultura a nivel mundial, 2016*
- Cuadro 2. *Principales productores en acuicultura a nivel mundial en 2015*
- Cuadro 3. *Principales productores acuícolas de América en 2015*
- Cuadro 4. *Principales productores de Trucha arcoíris a nivel mundial, 2015*
- Cuadro 5. *Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad acuícola nacional por ámbito y según especie, 2012-2016*
- Cuadro 6. *Producción nacional de trucha arcoíris, 2007-2016*
- Cuadro 7. *Países de destino de exportación de la trucha arcoíris del Perú, 2015*
- Cuadro 8. *Parámetros físicos y químicos del agua para la crianza de trucha comercial*
- Cuadro 9. *Parámetros físico-químicos del agua durante el presente estudio, 2015*
- Cuadro 10. *Distribución de grupos experimentales y diluciones de las cepas de Yersinia ruckeri provenientes de Huaraz inoculadas por vía intramuscular, 2015*
- Cuadro 11. *Clasificación de la lesión según el grado de afección por su extensión.*
- Cuadro 12. *Clasificación de la degeneración grasa de acuerdo a severidad y extensión.*
- Cuadro 13. *Frecuencia de signos clínicos en los grupos experimentales inoculados con Yersinia ruckeri durante el estudio, 2015*
- Cuadro 14. *Índice de morbilidad de los grupos experimentales inoculados con Y. ruckeri durante el estudio, 2015*
- Cuadro 15. *Frecuencia de lesiones externas e internas en los grupos experimentales inoculados con Y. ruckeri durante el estudio, 2015*
- Cuadro 16. *Índice de mortalidad de los grupos experimentales inoculados con Y. ruckeri durante el estudio, 2015*
- Cuadro 17. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia relativa en hígado de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*
- Cuadro 18. *Frecuencia relativa y absoluta de degeneración grasa en hígado en los grupos experimentales y control, 2015*
- Cuadro 19. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en hígado en los grupos experimentales y control, 2015*

- Cuadro 20. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de melanomacrófagos en hígado en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 21. *Frecuencia relativa y absoluta de congestión en hígado en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 22. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en bazo de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*
- Cuadro 23. *Frecuencia relativa y absoluta de congestión en bazo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 24. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de melanomacrófagos en bazo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 25. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de bacterias en bazo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 26. *Frecuencia relativa y absoluta de dilatación de vasos sanguíneos en bazo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 27. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en bazo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 28. *Frecuencia relativa y absoluta de linfocitos lisados en bazo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 29. *Frecuencia relativa y absoluta de disminución linfoide en bazo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 30. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en riñón anterior de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*
- Cuadro 31. *Frecuencia relativa y absoluta de melanomacrófagos en riñón anterior en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 32. *Frecuencia relativa y absoluta de túbulos regenerados en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 33. *Frecuencia relativa y absoluta de disminución linfoide en riñón en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 34. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en riñón anterior en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 35. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de gotas hialinas en riñón en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 36. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de bacterias en riñón en los grupos experimentales, 2015*



- Cuadro 37. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en intestino de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*
- Cuadro 38. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en intestino en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 39. *Frecuencia relativa y absoluta de bacterias en intestino en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 40. *Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia de enterocitos en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 41. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en músculo de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*
- Cuadro 42. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en músculo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 43. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de células inflamatorias en músculo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 44. *Frecuencia relativa y absoluta de infiltración de macrófagos y linfocitos en músculo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 45. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de bacterias en músculo en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 46. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en branquias de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*
- Cuadro 47. *Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia y fusión de lamelas en branquias en los grupos experimentales, 2015*
- Cuadro 48. *Frecuencia relativa y absoluta de congestión en branquias en los grupos experimentales, 2015*

## **LISTA DE ANEXOS**

**Anexo N° 1.** Protocolo de PCR convencional

**Anexo N° 2.** Procesamiento de las muestras para histopatología

**Anexo N° 3.** Fotos de signos clínicos, lesiones externas e internas en truchas arcoíris inoculadas con *Yersinia ruckeri*

## LISTA DE SIGLAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- CMM: células melanomacrófagos
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Del inglés: “Food and Agriculture Organization”)
- FMV-UNMSM: Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- H&E: Tinción Hematoxilina y Eosina
- H<sub>2</sub>S: Acido Sulfhidrico
- IgM: Inmunoglobina de tipo “M”
- KDa: Kilo Daltons.
- OMP: Proteínas de membrana externa (Del inglés: : “Outer membrane proteins”)
- PBS: Tampón fosfato salino (Del inglés: “Phosphate buffered saline”)
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés: “Polymerase Chain Reaction”)
- Ppm: partes por millón.
- PRODUCE: Ministerio de la Producción.
- PROMPERU: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo.
- SIM: Sulfuro indol motilidad
- TM: Toneladas métricas.
- TSA: Agar Soya Tripticasa (Del inglés: “Trypticase Soy Agar”)
- TSB: Caldo Soya Tripticasa (Del inglés: “Trypticase Soy Brood”)
- TTSS: Sistema de secreción tipo tres (Del inglés: “Type three secretion system”)
- UFC: Unidad formadoras de Colonia
- Yrp1: Proteasa de la Yersinia (Del inglés: “*Yersinia ruckeri* protease 1”)

## I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura en Perú se ha incrementado notablemente durante la última década, donde destaca la producción de langostinos, conchas de abanico y truchas arcoíris (PRODUCE, 2015). Una de las enfermedades bacterianas que más afecta la crianza de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es la Enfermedad de la boca roja o Yersiniosis, la cual es ocasionada por *Yersinia ruckeri*, produciendo pérdidas significativas en las piscigranjas (Tobback *et al.*, 2007). En nuestro país, se han aislado diferentes cepas de *Y. ruckeri* provenientes de diversos lugares de cultivos como Junín, Lima, Huancavelica, Cuzco, Puno y Huaraz entre los años 2004 y 2016. (Bravo y Kojagura, 2004; Sirvas *et al.*, 2011; Fernández, 2011; Sierralta *et al.*, 2013, Sandoval *et al.*, 2016). *Yersinia ruckeri* es una enterobacteria gramnegativa que produce una septicemia generalizada con hemorragias en la superficie del cuerpo y en los órganos internos de las truchas (Barnes, 2011). La mayoría de las investigaciones previas sobre la infección por *Y. ruckeri* en varias especies de peces se basa generalmente en los aislados de esta bacteria; sin embargo, la investigación sobre la patogenicidad de las diferentes cepas de *Y. ruckeri* en truchas arcoíris es muy limitada (Avci y Birincioglu, 2005). La variabilidad fenotípica observada en los aislados nacionales de *Y. ruckeri* (Flores, 2013) reafirma la necesidad de una constante vigilancia de la composición bioquímica y serológica de esta bacteria y estudios de patogenicidad de este agente, para que la acción protectora a través de vacunas sea adecuada. Debido a los antecedentes e investigaciones en el país, se propuso realizar el estudio de patogenicidad de una cepa móvil de *Y. ruckeri* procedente de Huaraz en truchas arcoíris, el cual permitió identificar signos clínicos, lesiones externas e internas en los peces; y caracterizar histológicamente lesiones en diferentes órganos.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Situación actual de la acuicultura**

#### **2.1.1 Acuicultura.**

El Ministerio de la producción- PRODUCE (2008) define a la acuicultura como: El conjunto de actividades tecnológicas orientadas al cultivo o crianza de especies acuáticas que abarca su ciclo biológico completo o parcial y se realiza en un medio seleccionado y controlado en ambientes hídricos naturales o artificiales, tanto en aguas marinas, dulces o salobres.

#### **2.1.2 Acuicultura mundial.**

Ante la estabilidad de la producción de la pesca de captura desde finales de la década de 1980, la acuicultura ha tenido un rápido crecimiento (Figura 1) y su producción representa actualmente más del 50 % de organismos acuáticos destinados para consumo humano a nivel mundial, con un crecimiento anual promedio de 3.2% (FAO, 2016).

La producción acuícola mundial del 2014 ascendió a 73,8 millones de toneladas, lo que se estimó en un valor de primera venta de 160.200 millones de USD (Cuadro 1), compuesto por 49,8 millones de toneladas de peces de escama (99.200 millones de USD), 16,1 millones de toneladas de moluscos (19.000 millones de USD), 6,9 millones de toneladas de crustáceos (36.200 millones de USD) y 7,3 millones de toneladas de otros animales acuáticos como las ranas (3.700 millones de USD) (FAO, 2016).

Para 2014, la FAO registró los datos sobre la producción de 580 especies acuáticas o grupos de especies acuáticos cultivados en todo el mundo, incluidos los cultivados anteriormente. Entre estas especies se cuentan 362 peces de escama, 104 moluscos, 62 crustáceos, 6 ranas y reptiles, 9 invertebrados acuáticos y 37 plantas acuáticas (FAO, 2016).

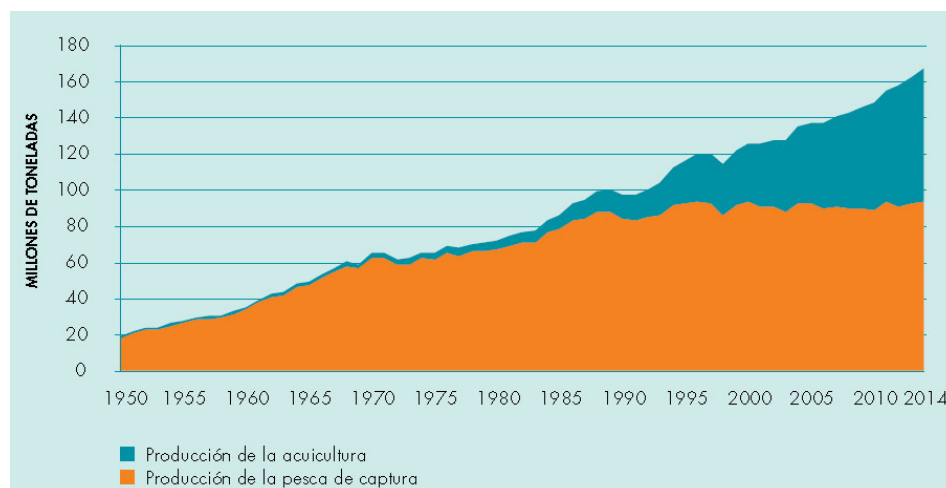


Figura 1. Producción mundial de la pesca y la acuicultura, FAO, 1950-2014

Entre los principales países productores en acuicultura, China representa el 58 % de la producción mundial (Cuadro 2), seguido también de otros países asiáticos como la India, Vietnam, Bangladesh y Filipinas; el Perú se ubica en el trigésimo noveno puesto a nivel mundial con 90 976 TM (FAO, 2016).

Cuadro 1. Producción de los principales grupos de especies comestibles procedentes de la acuicultura a nivel mundial, 2016

		ACUICULTURA CONTINENTAL	ACUICULTURA MARINA Y COSTERA	TOTAL
		(Toneladas)		
<b>Mundo</b>	Peces de escama	43.559.260	6.302.631	49.861.891
	Moluscos	277.744	15.835.450	16.113.194
	Crustáceos	2.744.537	4.170.536	6.915.073
	Otros animales	520.850	372.718	893.568
	<b>TOTAL MUNDIAL</b>	<b>47.102.391</b>	<b>26.681.334</b>	<b>73.783.725</b>

Fuente: FAO

El crecimiento de la acuicultura en América durante los últimos veinte años pasó de 919 mil toneladas a 3.2 millones de toneladas, lo que equivale a un incremento del 348% con un promedio de 364 mil personas involucradas directamente a esta actividad. Chile se ubica en el primer puesto con el 32.19% de la producción acuícola (Cuadro 3), seguido de Brasil con 17.5%, Ecuador con el 12.98%, USA con 12.96%; entre otros. (FAO, 2016).



Cuadro 2. *Principales productores en acuicultura a nivel mundial en 2015*

Nº	País	TM	%
1	China	61536375	58.05
2	Indonesia	15649311	14.76
3	India	5238019	4.94
4	Vietnam	3450200	3.25
5	Filipinas	2348159	2.22
6	Bangladesh	2060408	1.94
7	Corea del Sur	1676489	1.58
8	Noruega	1380890	1.3
9	Egipto	1174831	1.11
10	Japón	1103235	1.04
11	Chile	1057742	1
12	Myanmar	999630	0.94
13	Tailandia	897096	0.85
14	Brasil	575260	0.54
15	Corea del Norte	553950	0.52
	Resto del mundo	6302589	5.95
	<b>Total</b>	<b>106004184</b>	<b>100</b>

Fuente: Fishstat- FAO

Elaboración: Propia

Cuadro 3. *Principales productores acuícolas de América en 2015*

País	TM	%
<b>Chile</b>	1057742	32.19
<b>Brasil</b>	575260	17.51
<b>Ecuador</b>	426410	12.98
<b>USA</b>	425973	12.96
<b>México</b>	211622	6.44
<b>Canadá</b>	187374	5.7
<b>Colombia</b>	95857	2.92
<b>Perú</b>	90976	2.77
<b>Honduras</b>	55100	1.68
<b>Cuba</b>	30550	0.93
<b>Otros</b>	129264	3.93
<b>Total</b>	<b>3286128</b>	<b>100</b>

Fuente: Fishstat- FAO

Elaboración: Propia

Según el FishStat-FAO (2017), Irán ocupa el primer puesto en producción mundial de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), representando el 18.46% del total; seguido de Turquía, Chile, Noruega, Perú; entre otros.

Cuadro 4. *Principales productores de Trucha arcoíris a nivel mundial, 2015*

País	TM	%
<b>Irán</b>	140632	18.46
<b>Turquía</b>	100411	13.18
<b>Chile</b>	94508	12.41
<b>Noruega</b>	72921.39	9.57
<b>Perú</b>	40946.5	5.38
<b>Francia</b>	36500	4.79
<b>Italia</b>	31300	4.11
<b>China</b>	27335	3.59
<b>Rusia</b>	24431	3.21
<b>USA</b>	20799	2.73
<b>Otros</b>	171982.05	22.58
<b>Total</b>	761765.94	100

Fuente: Fishstat- FAO

Elaboración: Propia

### 2.1.3 Acuicultura nacional.

La acuicultura en nuestro país se basa en tres especies principales como el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), y langostino (*Litopenaeus vannamei*); además se cultivan en menor volumen especies como tilapia (*Oreochromis spp.*), gamitana (*Colossoma macropomum*), paiche (*Arapaima gigas*), paco (*Piaractus brachipomus*), pacotana (*C. macropomum x P. brachipomus*); entre otros (PRODUCE, 2015).

La producción acuícola peruana ha tenido un crecimiento del 29% en su producción durante los años 2012-2016 (Cuadro 5), con más 93 mil TM en el año 2016, siendo el 58.8% proveniente del ámbito continental y el 41.2% restante del ámbito marino (PROMPERU, 2016).

Cuadro 5. *Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad acuícola nacional por ámbito y según especie, 2012-2016*

Ámbito / Especie	2012	2013	2014	2015	2016
<b>Continental</b>	<b>29,564</b>	<b>40,068</b>	<b>38,683</b>	<b>45,758</b>	<b>54,925</b>
Trucha	24,762	34,992	32,923	40,946	48,594
Tilapia	3,174	3,840	4,610	3,250	2,913
Gamitana	453	531	504	299	1,144
Paiche	637	94	55	135	400
Otros	537,9	610,9	590,3	1.127,6	1.873,2
<b>Marítimo</b>	<b>42,730</b>	<b>85,625</b>	<b>76,586</b>	<b>45,218</b>	<b>38,519</b>
Concha de Abanico	24,782	67,694	55,096	23,029	18,501
Langostino	17,801	17,883	21,484	22,183	20,013
Otros	147	47,3	6,5	6,6	4,4
<b>Total</b>	<b>72,293</b>	<b>125,693</b>	<b>115,269</b>	<b>90,976</b>	<b>93,444</b>

Fuente: PRODUCE

#### 2.1.4 Producción nacional de trucha.

La trucha arcoíris se introduce en el país en 1928 para fines deportivos con la importación de ovas y alevines traídos desde USA (Kuramoto, 2008). Debido a que el Perú cuenta con características geográficas, hidrográficas y climáticas adecuadas para el desarrollo de esta especie (Luna *et al.*, 2005), el cultivo de trucha arcoíris fue adaptándose y desarrollándose muy bien a las condiciones de las aguas de la sierra por encima de los 2000 msnm, inclusive muchos la consideran como una especie propia del país, por su amplia distribución (Mendoza, 2011); aunque las ovas embrionadas provengan de USA, Dinamarca, España, entre otros (PRODUCE, 2015).

Según PROMPERU (2016), la producción nacional de trucha arcoíris (Cuadro 6) tuvo un incremento de 590% desde el año 2007 al 2016, llegando a representar para el 2016, el 52% de la producción acuícola nacional por encima de otras especies, como la concha de abanico y el langostino. Las regiones con una gran producción son Puno, Huancavelica y Junín, en respectivo orden de importancia, destinándose el 82% de su producción total al consumo interno y el resto para su exportación (PRODUCE, 2015).

Cuadro 6. *Producción nacional de trucha arcoíris, 2007-2016*

<b>Año</b>	<b>TM</b>
<b>2007</b>	6,997
<b>2008</b>	12,497
<b>2009</b>	12,817
<b>2010</b>	14,250
<b>2011</b>	19,962
<b>2012</b>	24,762
<b>2013</b>	34,992
<b>2014</b>	32,923
<b>2015</b>	40,946
<b>2016</b>	48,594

Fuente: PRODUCE

El año 2015 nuestro país exportó más de dos mil TM de trucha arcoíris (Cuadro 7) por un valor de más de 12, 5 millones de dólares americanos, teniendo como países de destino a Estados Unidos, Canadá, Noruega, Suecia, entre otros (PRODUCE, 2015); realizándose en presentaciones de trucha entera congelada y filete congelado (PROMPERU, 2016).

Cuadro 7. *Países de destino de exportación de la trucha arcoíris del Perú, 2015*

<b>País</b>	<b>TM</b>	<b>US\$</b>
<b>Estados Unidos</b>	597	5,223,710
<b>Canadá</b>	312	2,531,639
<b>Noruega</b>	56	358,352
<b>Suecia</b>	38	265,962
<b>Otros</b>	1112	4,211,420
<b>Total</b>	<b>2114</b>	<b>12,591,083</b>

Fuente: PRODUCE

## 2.2 Trucha arcoíris

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es un pez salmónido originario de las cuencas que alimentan al océano Pacífico en norte américa, las cuales van desde Alaska hasta México. Esta especie ha sido introducida desde el siglo XIX en las aguas de todos los continentes, con excepción de la Antártida, para propósitos recreacionales, como pesca deportiva, y para acuicultura (FAO, 2017). Por otra parte, es un pez resistente de fácil desove, crecimiento rápido, tolerante a muchos ambientes y manejos. La trucha arco iris es capaz de ocupar muchos hábitats diferentes, que abarcan desde un ciclo de vida anádromo, pudiendo vivir en el océano pero desovando en ríos, hasta habitar de manera permanente en lagos. De esta manera se le ha logrado introducir a más de 80 países, los cuales presentan condiciones favorables para su cultivo (Aquino, 2009; FAO, 2017).

### 2.2.1 Clasificación taxonómica.

Según Eschmeyer (2007), la clasificación de la trucha arcoíris es la siguiente:

Reino	:	Animalia
Filo	:	Chordata
Sub Filo	:	Vertebrata
Clase	:	Actinopterygii
Orden	:	Salmoniformes
Sub Orden	:	Salmonidei
Familia	:	Salmonidae
Género	:	<i>Oncorhynchus</i>
Especie	:	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	:	Trucha arco iris (español) Rainbow trout (inglés)

### 2.2.2 Características generales y biológicas.

La trucha arcoíris tiene un tamaño y peso máximo de 1.3 m y 9 kg, respectivamente. El peso promedio en el ambiente natural, se encuentra entre 0.5 a 1 kg; así mismo el tamaño y peso comercial están entre 22-25 cm y 250-300 g, respectivamente. (PRODUCE, 2009)

Esta especie tiene el cuerpo cubierto con finas escamas y de forma fusiforme, su coloración varía de acuerdo a su medio ambiente, edad, estado de maduración sexual y otros factores. En riachuelos sombreados presentan un color plomo oscuro, mientras que en estanques muy expuestos al sol presenta una tonalidad mucho más clara, verde oliva en la parte superior luego una franja rojiza y el abdomen blanco; además posee una gran cantidad de máculas negras en la piel, parecido a lunares, por lo que en otros lugares se le conoce también como trucha pecosa (Figura 2). La trucha arcoíris debe su nombre por la presencia de una franja de colores de diferentes tonalidades, predominando una franja rojiza sobre la línea lateral en ambos lados del cuerpo (RAGASH, 2009).

La trucha arcoíris es carnívora y en estado silvestre se alimenta de presas vivas, como larvas de insectos, moluscos, crustáceos, gusanos, renacuajos y peces pequeños (RAGASH,

2009). Tiene un aparato digestivo muy corto, el cual está preparado para el aprovechamiento de proteínas animales, pudiendo sólo digerir y aprovechar una variedad muy limitada de alimentos vegetales (Aquino, 2009).

El hábitat natural de la trucha arcoíris son los ríos, lagos y lagunas de aguas frías, limpias y cristalinas. Esta especie prefiere las corrientes moderadas y ocupa mayormente los tramos medios de fondos pedregosos y moderada vegetación. Es un pez de aguas frías viviendo muy bien entre 10 a 16°C, aunque el grado de tolerancia a la temperatura es amplio, pudiendo resistir temperaturas de 25°C o límites inferiores cercanos a la congelación durante varios días (Aquino, 2009).



*Figura 2.* Ejemplar típico de Trucha arcoíris

### **2.2.3 Etapas de desarrollo.**

El ciclo de vida de la trucha arcoíris se dividen generalmente en las siguientes etapas (RAGASH, 2009; FONDEPES, 2014):

- Ovas: Son huevos fecundados que luego de 30 días eclosionan y se convierten en larvas.
- Larva: Esta fase puede durar entre 15 a 30 días a una temperatura promedio de 10°C. En esta etapa se observa la presencia del saco vitelino.
- Alevín: Son peces que miden  $\geq 5$  cm hasta los 10 cm y peso promedio de 12 g aproximadamente. Esta fase tiene una duración aproximada de 03 meses dependiendo de la temperatura del agua.
- Juvenil: Las truchas arcoíris tienen una talla promedio de 10 cm hasta alcanzar los 17 cm, con peso promedios de 68.0 g, aproximadamente. Esta fase tiene una duración aproximada de 02 meses.
- Engorde: Esta etapa comprende el cultivo de trucha arco iris, desde su talla promedio de 17 cm hasta alcanzar los 26 cm., equivalente a un peso promedio de 250 g. Esta fase dura aproximadamente unos 3 meses.



#### 2.2.4 Tipos de crianza.

Según PRODUCE (2009) en el Perú las truchas arcoíris se cultivan en forma extensiva en lagunas, en forma semi-intensiva en estanques, y en forma intensiva en jaulas flotantes o estanques.

#### 2.2.5 Parámetros del recurso hídrico para el cultivo.

El agua a utilizar, debe tener las características adecuadas en cuanto a su cantidad y calidad. Las propiedades físicas, como temperatura, pH, oxígeno, transparencia, turbidez, entre otros; pueden estar sometidas a grandes variaciones por la influencia de factores externos, como cambios atmosféricos y climáticos. Por otro lado las propiedades químicas son más estables y con sus variaciones mínimas, a menos que una contaminación pueda producir efectos irreversibles (Cuadro 8). Desde el punto de vista biológico, la calidad del agua está relacionada a la presencia o no de organismos vivos en el medio acuático (RAGASH, 2009).

Cuadro 8. *Parámetros físicos y químicos del agua para la crianza de trucha comercial*

Parámetro	Rango Óptimo
Temperatura (°C)	10-16
Oxígeno disuelto (ppm)	6.5-9
pH	6.5 –8.5
CO <sub>2</sub> (ppm)	< 7
Alcalinidad (mg/l CaCO <sub>3</sub> )	20- 200
Dureza (mg/l CaCO <sub>3</sub> )	60- 300
NH <sub>3</sub> (mg/l)	< 0.02
H <sub>2</sub> S (mg/l)	≤ 0.002
Nitratos (mg/l)	< 100
Nitritos (mg/l)	< 0.055
Nitrógeno amoniacal (mg/l)	< 0.012
Fosfatos (mg/l)	> 500
Sulfatos (mg/l)	> 45
Fierro (mg/l)	< 0.1
Cobre (mg/l)	< 0.05
Plomo (mg/l)	0.03
Mercurio (mg/l)	0.05

Fuente: RAGASH

### 2.3 *Yersinia ruckeri*

#### 2.3.1 Identificación y clasificación.

*Yersinia ruckeri* es una bacteria gram-negativa, perteneciente a la familia de las Enterobacteriaceae. Es el agente causal de la enfermedad de la boca roja o yersiniosis, en

varias especies de salmónidos a nivel mundial, y fue aislada por primera vez en los años 50 en el Valle Hagerman en USA (Ross *et al.* 1966; Kumar *et al.*, 2015). La bacteria tiene generalmente una morfología bacilar con terminaciones romas, midiendo 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de largo, aunque en cultivos de más de 48 horas se producen células largas filamentosas (Barnes, 2011; Austin y Austin, 2016). Por otra parte, esta bacteria no forma esporas, ni posee cápsula y mayormente es móvil, ya que presenta de siete a ocho flagelos peritricos; sin embargo, los flagelos no funcionan a 9°C o menos, y a 35°C los flagelos están ausentes y el organismo es no mótil (Rucker, 1966; O'Leary, 1977; Austin y Austin, 2016).

Bioquímicamente, *Yersinia ruckeri* es caracterizada como glucosa fermentativa, catalasa positiva, citocromo-oxidasa negativa, nitrato reductora, con la habilidad de secretar  $\beta$ -galactosidasa, lisina y ornitina descarboxilasas, pero no produce sulfuro de hidrógeno ni indol correspondiente. Además no fermenta inositol, rhamnosa, sucrosa, melibiosa y arabinosa (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011; Austin y Austin, 2016).

Las diferentes cepas de *Yersinia ruckeri* pueden ser clasificadas por su biotipo, serotipo y proteínas de membrana externa (OMP). En relación al biotipo se subdivide en dos, biotipo I y II. Las cepas del biotipo I tienen capacidad para fermentar lipasa (Tween 20) y ser positivas para motilidad; a diferencia de las cepas del biotipo II, las cuales son negativas para ambas pruebas (Gibello *et al.* 2004; Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011).

En diversos estudios se han establecido cuatro serotipos con diferentes subgrupos, esto con base en la reacción de antígenos totales con antisueros específicos. El serotipo O1, el cual es predominante a nivel mundial, es subdividido en dos subgrupos O1a (serovar I) y O1b (serovar III), y el serotipo O2 (serovar II) en tres subgrupos O2a, O2b y O2c. Los demás serotipos se clasifican como serotipo O3 (serovar V) y serotipo O4 (serovar VI) (Ross *et al.*, 1966; O'Leary, 1977; Bullock *et al.*, 1978; Stevenson y Ardie, 1984; Daly *et al.*, 1986; Romalde y Toranzo, 1993a; Barnes, 2011; Tinsley *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015; Austin y Austin, 2016).

El perfil de las OMP ha sido reportado por algunos autores. En un estudio, donde se analizaron más de 130 aislados de *Y. ruckeri*, se identificó cinco perfiles de proteínas de membrana externa (desde el OMP-1 al OMP-5) usando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, (Davies, 1991). Además, Romalde y Toranzo (1993a) identificaron cuatro perfiles de OMP que pertenecían a los serovares (I, II, V y VI) con tres sub-perfiles, con variaciones menores para el serovar II, y sin encontrar mayores diferencias entre los patrones de los serovares I y III. No se ha reportado, por otros autores,

correspondencia entre la clasificación según las OMP y otros tipos de serotipificación (Sousa *et al.*, 2001).

En nuestro país, se realizó la serotipificación de 30 cepas de *Y. ruckeri* aisladas de cuatro piscigranjas de la sierra central, perteneciendo todas las cepas al serotipo O1a, con el mismo perfil de bandas de LPS y de OMP tipo 3 (Bastardo *et al.*, 2011). Adicionalmente otros estudios reportaron, la presencia de los biotipos I y II en diversas piscigranjas de la sierra central del Perú, tanto en peces que presentaban signos compatibles con yersiniosis como en peces asintomáticos (Bueno, 2011; Sierralta, 2011; López, 2012).

### **2.3.2 Factores de virulencia.**

Actualmente hay poca información sobre los factores de virulencia de *Y. ruckeri*, esto debido al desarrollo temprano de vacunas eficaces para la prevención y control de la yersiniosis; sin embargo, hay estudios muy útiles sobre este aspecto.

#### **2.3.2.1 Sobrevivencia en el medio acuático.**

Inicialmente se creía que *Y. ruckeri* era un patógeno obligatorio, y que sólo se transmitía entre un pez portador, u otro vector vivo, y un pez sano; sin embargo, muchos estudios indican que la bacteria es capaz de sobrevivir en agua y sedimento por más de 3 meses. (Romalde *et al.*, 1994; Austin y Austin, 2016). Esta sobrevivencia fuera del agua depende de la salinidad, *Y. ruckeri* sobrevive aguas dulces o salobres (0- 20 ppm) por al menos 4 meses, mientras que la sobrevivencia disminuye enormemente en aguas con salinidad de 35 ppm. (Thorsen *et al.*, 1992). Estos diferentes periodos de sobrevivencia contribuyen probablemente a la baja incidencia de la enfermedad en aguas saladas, sin embargo la habilidad de sobrevivir por largos periodos en aguas con bajas concentraciones de sal podría ser un factor importante en el control de la yersiniosis en salmónidos de agua dulce (Fernández *et al.*, 2007a).

#### **2.3.2.2 Capacidad de formar biopelícula, adherencia e invasión.**

Las biopelículas son importantes para la sobrevivencia de *Y. ruckeri* en el medio ambiente, ya que mejoran la resistencia a antibióticos y permiten su adherencia en tejidos de los peces y a partes sólidas (fibra de vidrio, concreto, madera y PVC) (Fernández *et al.*, 2007a; Barnes, 2011). Coquet *et al.* (2002) demostraron la presencia de biopelículas de *Y. ruckeri* en sedimentos y algas en una piscigranja de Francia. Además los aislados bacterianos de estas biopelículas demostraron ser resistentes al ácido oxolínico, y la formación de la biopelícula fue correlacionada a la motilidad mediada por flagelos de *Y. ruckeri*.

La adherencia e invasión de *Y. ruckeri* han sido demostradas en líneas celulares y en tejido branquial e intestinal (Romalde y Toranzo, 1993b; Tobback *et al.*, 2010a, 2010b). Otros estudios reportan la presencia de genes parálogos envueltos en esta adhesión e invasividad de *Y. ruckeri*, como el gen *yrInv* y un gen parecido al *yrInv*, presentes también en otras especies de *Yersinia*. Sin embargo los mecanismos y otras moléculas involucradas en este proceso aún no han sido descritos (Fernández *et al.*, 2007a; Wrobel *et al.*, 2017).

#### **2.3.2.3 Ruckerbactina.**

La adquisición de hierro dentro del hospedero es importante en la mayoría de bacterias patógenas, las cuales compiten con los sistemas de retención de hierro de alta afinidad propia de los hospederos, tales como la transferrina, la lactoferrina y otros compuestos (Bullen, 1987). En el caso de *Y. ruckeri* se identificó un sideróforo de tipo catecol, denominado ruckerbactina, la cual permite quelar al hierro con una alta afinidad (Fernández *et al.*, 2004). Los genes del sistema de ruckerbactina, *rucC* y *rupDGC*, son controlados positivamente por la limitación del hierro, y de manera negativa por la temperatura, siendo más altos a 18°C que a 22°C (Fernández *et al.*, 2004, 2007a). El gen *rucC*, envuelto en la síntesis del sideróforo, y el gen *rupDGC*, que codifica el sistema de transporte en membrana de la ruckerbactina, son regulados positivamente en condiciones pobres de hierro, siendo el gen *rucC* mayormente expresado a diferencia del gen *rupDGC* (Fernández *et al.*, 2004).

#### **2.3.2.4 Toxinas extracelulares.**

Los productos extracelulares producidos por *Y. ruckeri* incluyen lipasas, proteasas, y actividad hemolítica contra eritrocitos de distinto origen y propiedades citotóxicas en algunos cultivos de líneas celulares, los cuales producen algunos de los signos clínicos de la enfermedad como las hemorragias en la boca y en el intestino (Bourne *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2007a).

*Yersinia ruckeri* produce una metaloproteasa denominada Yrp1, de 47-kDa de peso, la cual forma parte de la familia de las serralisinas (Fernández *et al.*, 2003). A diferencia de otras especies de *Yersinia*, el gen que codifica la proteasa *yrp1* es parte de un operón compuesto por tres genes denominados *yrpD*, *yrpE* e *yrpF*, que codifican un sistema de proteína transportador ABC de tipo I; y un gen *inh*, el cual codifica un inhibidor de la proteasa (Fernández *et al.*, 2002, 2003). Por otra parte, la Yrp1 no es una molécula presente en todos los serovares de *Yersinia ruckeri*, presentando el serovar tipo I una actividad proteasa mayor en comparación con los demás serovares (Fernández *et al.*, 2002, 2003). Adicionalmente, la Yrp1 proteasa contribuye en la virulencia de *Y. ruckeri*, favoreciendo la

colonización e invasión de diferentes tejidos de su hospedador (Dahiya y Stevenson, 2010; Ryckaert *et al.*, 2010).

La Yrp1 proteasa es capaz de degradar una vasta variedad de proteínas de la matriz extracelular, proteínas musculares y particularmente la laminina, principal unidad de las membranas basales, esta degradación puede ser la causa de la alteración de las membranas, la cual lleva a la erosión y formación de poros en capilares causando las hemorragias en cavidad oral e intestino (Fernández *et al.*, 2002, 2003). Es debido a esto, que se genera el signo típico de la hemorragia alrededor de la boca y en el intestino (Fernández *et al.*, 2002).

La expresión de la proteasa está influenciada por condiciones microambientales, existiendo una inhibición en bajas concentraciones de carbono y nitrógeno (Ryckaert *et al.* 2010; Tobback *et al.*, 2010a; Wiens y Vallejo, 2010). Asimismo, la glucosa y fructosa son reconocidos como altos inhibidores de la producción de la proteasa Yrp1, mas no así para carbohidratos como el glicerol, manitol y maltosa (Mendez *et al.*, 2010; Navais *et al.*, 2010). Por otro lado, el incremento de la osmolaridad y la temperatura del medio manifiestan una regulación positiva sobre esta proteasa (Fernández *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2010). Sin embargo, a una mayor presión osmótica se ha encontrado una disminución de la producción de la proteasa. Se requiere que magnesio y calcio estén presentes para una mayor actividad y caracterización de la proteína (Ryckaert *et al.*, 2010).

La hemolisina YhIA es otro producto extracelular identificado de *Y. ruckeri*, la cual ha mostrado tener actividad hemolítica y ser regulada por las condiciones de hierro y temperatura del medio. (Fernández *et al.*, 2007b). Uno de los genes asociados a la hemolisina, aislado por tecnología de expresión in vivo, tenía una alta homología con los genes que codifican proteínas implicadas en la secreción y activación de las hemolisinas de tipo Serratia (Fernández *et al.*, 2004). Además, otros estudios con mutantes de inserción demostraron que esta toxina no solo estaba implicada en la virulencia, sino también en la citotoxicidad (Fernández *et al.*, 2007b).

#### **2.3.3.4 Plásmidos.**

Se ha determinado una asociación entre la presencia de plásmidos y la función fagocítica dañada, en la cual un plásmido de 70MDa (encontrado en varios aislados del serotipo I) disminuyó la respuesta quimioluminiscente en macrófagos de róbalo rayado (Stave *et al.*, 1987). Otros estudios reportan que este plásmido largo no es homólogo con plásmidos virulentos de otras *Yersinias* patógenas para humanos. Por otro parte, aún falta determinar la participación en la patogenicidad de *Y. ruckeri* de este plásmido (De Grandis y Stevenson, 1982; Romalde y Toranzo, 1993b; Cutrin *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 1998).

Welch *et al.* (2007) han descrito un plásmido en *Y. ruckeri* denominado pYR1, el cual lleva muchos determinantes de resistencia antibiótica y además codifica un sistema de transferencia conjugativo tipo IV.

#### **2.3.3.5 Sistema de secreción de tipo III.**

Los macrófagos eliminan y/o destruyen la mayoría de las bacterias mediante la fagocitosis. Sin embargo, la bacteria posee varios mecanismos para evitar la fagocitosis o resistir los procesos antimicrobianos de su hospedero, estableciendo de esta manera su infección. Uno de estos mecanismos es el sistema Yop (Yersinia outer proteins) codificado por plásmido, el cual caracteriza a las bacterias del género *Yersinia* (Trosky *et al.*, 2008). Este plásmido codifica un sistema de secreción de Tipo III (TTSS) que libera varias proteínas efectoras, también codificadas en el plásmido, dirigidas al sistema de actina y así paralizar la fagocitosis. También se dirigen a las vías de señalización claves del sistema inmune, incluidas MAPK quinasas e IKB quinasa- $\beta$ , lo que reduce la explosión respiratoria y promueve la apoptosis (Trosky *et al.*, 2008).

Gunasena *et al.* (2003) encontraron genes que codifican un TTSS en *Y. ruckeri*, pero las proteínas efectoras asociadas aún no se han reportado. Inicialmente, el gen de ATPasa tipo III, ysaN, asociado con TTSS se identificó utilizando un PCR degenerado. Posteriormente, se determinó la organización del operón circundante y se encontró una alta homología entre el operón ysa de *Y. ruckeri*, y un grupo de genes ysa que codifica el TTSS en *Y. enterocolitica* (Gunasena *et al.*, 2003). Aún no se ha establecido un papel para este TTSS en *Y. ruckeri* (Barnes, 2011).

#### **2.3.3.6 Sistema de secreción de tipo IV.**

*Yersinia ruckeri* contiene cromosómicamente un sistema de secreción tipo IV (TFSS), el cual está asociado a su virulencia. Si bien no está descrito completamente, se cree que podría ayudar en la sobrevivencia intracelular de esta bacteria intracelular facultativa (Mendez *et al.*, 2009). El operon traH-N produce este TFSS, y parece estar regulado por la temperatura, siendo muy expresada a 18°C, tal como sucede con la proteasa Yrp1, la hemolisina Yh1A y la ruckerbactina, sugiriendo que la temperatura es un factor determinante muy importante en la virulencia de *Y. ruckeri* (Fernández *et al.*, 2002, 2003, 2007a; Mendez *et al.*, 2009, Barnes, 2011).

## **2.4 Enfermedad de la Boca Roja o Yersiniosis**

### **2.4.1 Hospedero y distribución.**

La enfermedad de la boca roja es predominantemente una enfermedad de salmónidos, siendo aislada por primera vez en un centro de cultivo de truchas arcoíris en USA. *Y. ruckeri*



afecta tanto a salmónidos de aguas dulces y salobres, como a los salmónidos de agua salada (Ross *et al.*, 1966; Rucker, 1966, Tobback *et al.*, 2007). Por otro lado, esta bacteria ha sido aislada también en salmón coho (*Oncorhynchus kitush*), salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), trucha degollada (*Salmon clarki*), salmón del atlántico (*Salmon salar*), trucha marrón (*Salmon trutta*), trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) y la trucha de manantial (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011).

En caso de peces no pertenecientes a la familia salmonidae, *Y. ruckeri* ha sido reportada en la anguila común (*Anguilla anguilla*), burbot (*Lota lota*), carpa cabeza (*Aristichthys nobilis*), cisco (*Coregonus artedii*), coregano peled (*Coregonus peled*), carpa común (*Cyprinus carpio*), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), esturión siberiano (*Acipenser baeri*), goldfish (*Carassius auratus*), lenguado común (*Solea solea*), pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Barnes, 2011; Kumar, 2015; Austin y Austin, 2016). Además se ha aislado en rata almizquera (*Ondatra zibethicus*), Halcones (*Falco spp.*), gaviotas (*Laridae*), tortugas (*Cheloniidae*), lombriz de humus (*Eisenia foetida*) y humanos (Farmer *et al.*, 1985; Willumsen, 1989, Tobback *et al.*, 2007).

Geográficamente, *Yersinia ruckeri* tiene una distribución mundial, habiendo sido aislada en Canadá, Europa, Medio Oriente, Sudamérica, China, India, Singapur, Australia, Sudáfrica y Egipto (Arias *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2007; Wheeler *et al.*, 2009; Wiens y Vallejo, 2010; Barnes, 2011).

#### **2.4.2 Transmisión y epidemiología.**

Las yersiniosis puede ser transmitida por contacto directo entre peces infectados y sanos (Tobback *et al.*, 2007). La transmisión por medio de peces portadores es muy importante, ya que se ha demostrado que peces infectados con *Y. ruckeri* pueden sobrevivir hasta dos meses luego de la infección natural y experimental. Además otros estudios demostraron que hasta el 25% de una población de truchas arcoíris portaba *Y. ruckeri* en el intestino posterior (Busch y Lingg; 1975; Rodgers, 1992).

Por otro lado, en condiciones de estrés, los brotes están asociados a diversos factores como alta temperatura, deficiente calidad del agua, condiciones ambientales pobres, bajos niveles de oxígeno, elevada densidad poblacional y transporte de especímenes (Capkin y Altinok, 2009). Los peces portadores estresados comienzan a eliminar *Y. ruckeri* por vía intestinal (heces), lo que permite la recurrencia de la enfermedad y aumento de la mortalidad en el lote, debido a que la bacteria puede sobrevivir hasta cuatro meses fuera del hospedador (Busch y Lingg; 1975; Tobback *et al.*, 2009, 2010b). Especies no salmónidas, invertebrados

acuáticos e incluso aves también pueden actuar como portadores de esta bacteria (Coquet *et al.*, 2002).

Las bacterias usan cilios o flagelos para moverse a través de las superficies y juntarse con otras colonias para formar microcolonias (O'Toole y Kolter, 1998). Actualmente se sabe que la formación de biopelículas es una característica importante para la sobrevivencia de bacterias en superficies y sedimentos de ambientes acuáticos (Pratt, 1998). Coquet *et al.*, (2002) demostraron que *Y. ruckeri* tiene la habilidad de formar biopelículas en materiales sólidos comúnmente encontrados en las piscigranjas, dicha habilidad está relacionada a la motilidad flagelar y constituye una fuente de infecciones recurrentes.

La transmisión vertical de *Yersinia ruckeri* no se ha determinado, pero se encontró el agente en ovas no fertilizadas de Salmon Chinook, cuya descendencia mostró una escasa mortalidad desde su fertilización hasta las 12 semanas de producción. En este estudio se determinó la presencia de ADN de *Y. ruckeri* en las ovas no fertilizadas y fluido ovárico, sugiriendo la posible transmisión vertical de este patógeno (Glenn *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015).

Rubio *et al.* (2010) afirman que la mayoría de enfermedades infecciosas en piscigranjas, son causadas por bacterias que generalmente forman parte de la microbiota o medio ambiente acuático del pez. Estos patógenos son facultativos u oportunistas, siendo considerados como un factor de riesgo en la sanidad de los sistemas acuícolas.

#### **2.4.3 Ruta de entrada y diseminación.**

Tobback *et al.* (2009) indicaron, a través de examinación histológica, que las branquias eran una importante vía de entrada para la infección por *Y. ruckeri*, la cual luego se expandía hacia otros órganos. Esta diseminación fue visualizada por inmunohistoquímica y tomografía de proyección óptica en órganos de truchas arcoíris (Ohtani *et al.*, 2014). Otros patógenos como *Vibrio anguillarum* y *Edwardsiella tarda* también presentan esta ruta como principal entrada de infección (Soto *et al.*, 2008).

Ohtani *et al.* (2014) afirman que *Y. ruckeri* infecta primero las lamelas branquiales secundarias, luego se extiende a la circulación por medio de las células del pavimento branquial al primer minuto post-infección. Luego podría ser detectada en la luz intestinal a los 30 minutos post-infección, en el riñón a los 3 días post-infección, y en el hígado, bazo, cerebro y corazón a los 7 días post-infección. Finalmente a los 21 días post-infección ya no era detectable en hígado, bazo, cerebro y corazón (Ohtani *et al.*, 2014).

#### **2.4.4 Respuesta inmune de los peces.**

Los primeros vertebrados que desarrollaron un sistema inmune completo fueron los peces hace unos 450-500 millones de años (Raida y Buchmann, 2009). Los peces son poiquiloterms, por lo cual son dependientes de la temperatura ambiental; esto da como resultado que la respuesta inmune adaptativa sea lenta y escasa, siendo la respuesta inmune innata muy importante en el pez (Mydlarz *et al.*, 2009).

Las células fagocíticas, como neutrófilos y macrófagos, son parte importante del sistema inmune del pez, observándose una respuesta inflamatoria frente *Y. ruckeri* en la trucha arcoíris (Alfonso *et al.*, 1998). Los niveles de expresión génica de CXCL, citocina, quimiocina, interleucina, receptor celular, inmunoglobulina, SCOS y genes CISH se han medido en trucha arco iris en respuesta a cepas de *Y. ruckeri* del biotipo 1 y cepas del biotipo 2 utilizando PCR-cuantitativo en tiempo real (Wiens *et al.* 2006; Raida y Buchmann, 2009, Raida *et al.*, 2011; Wiens y Vallejo, 2010; Raida *et al.*, 2011; Evenhuis y Cleveland, 2012). Estudios recientes sugieren que la producción de anticuerpos específicos contra *Y. ruckeri* puede desempeñar un papel importante en la protección contra la yersiniosis; por ejemplo, el amiloide “A” en suero, el cual es una de apolipoproteína, es considerada como una molécula importante del sistema inmune innato en la trucha arcoíris durante la infección por *Y. ruckeri* (Kania *et al.*, 2014). Todos estos estudios contribuyen a nuestra comprensión de cómo el sistema inmune innato y adaptativo en la trucha arcoíris responde tanto a la infección primaria como a la reinfección. Vale la pena señalar que todos estos estudios se basaron en la expresión de ARNm, que no siempre refleja con precisión la expresión de proteínas y los cambios bioquímicos (Paulson *et al.*, 2003).

Diversos autores afirman que el sistema inmune de los peces depende fundamentalmente de factores ambientales como la salinidad, temperatura y fotoperiodo; y también del estado fisiológico, como nutrición, edad, ciclo reproductivo, balance hormonal y estrés (Cossarini-Dunier *et al.*, 1988; Buchmann *et al.*, 2003; Raida y Buchmann, 2009).

Los cambios en los mecanismos bioquímicos, a nivel proteómico, en órganos de peces infectados con cepas de biotipo 1 y 2 de *Y. ruckeri*, aún deben ser investigados, esto con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de las proteínas cuya expresión difieren entre los biotipos de la bacteria (Kumar *et al.*, 2015).

#### **2.4.5 Signos clínicos.**

La yersiniosis puede afectar a peces de todas las edades, pero es más aguda en alevines y larvas. La enfermedad aparece como una forma más crónica en peces más grandes o

adultos. Los brotes suelen comenzar con bajas mortalidades durante cierto tiempo, lo cual resulta en altas pérdidas acumulativas de todo el lote (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011).

Según Fouz *et al.* (2006) y Tobback *et al.* (2007), los peces muestran cambios en el comportamiento, los cuales incluyen letargia, anorexia y dificultad al nadar, asimismo se encuentran muy cercanos a la superficie del agua. Los animales con cuadros crónicos manifiestan melanosis y una descoloración grisácea del hígado (Barnes, 2011; Kumar *et al.*, 2015). Además se ha observado un oscurecimiento y una disminución del tamaño tanto del riñón como del bazo (Buchmann *et al.*, 2003; Raida *et al.*, 2003).

Avci y Birincioglu (2005) reportaron que animales infectados con *Y. ruckeri* por vía intraperitoneal manifestaron, en la fase aguda de la enfermedad, cuadros de hiperemia y hemorragias en ojos, vejiga natatoria, branquias, en la base de aletas dorsales, ventrales y anal; así como, hemorragias subcutáneas dentro y alrededor de la boca y garganta, las cuales le dan el nombre común de la enfermedad. Además, el hígado y el bazo presentaron un aumento de tamaño.

Por otra parte, se han reportado hemorragias petequiales sobre la superficie del estómago y dentro del musculo lateral de truchas arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri* (Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2010b). Adicionalmente el estómago y los ciegos pilóricos tenían un contenido mucoso claro, e incluso algunos animales presentaron intestinos de consistencia flácida con contenido acuoso rojizo (Arias *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2010a).

Diversos autores describen la pérdida del apetito y letargia en los peces con fase crónica de la enfermedad. Por otra parte, también se presenta despigmentación o melanosis del pez, palidez de las agallas y exoftalmia (Lucangeli *et al.*, 2000; Altinok *et al.*, 2001, Barnes, 2011). Las exoftalmias habitualmente son acompañadas de hemorragias alrededor de la cavidad oral, mientras que en el hígado se observa un ligero aumento del tamaño con una descoloración amarillo-grisácea evidente. Otros autores reportan un engrosamiento de la mucosa de estómago, ciegos pilóricos e intestino con presencia de fluido amarillento (Stevenson y Airdrie, 1984; Cipriano *et al.*, 1986; Austin B y Austin D, 2016). Adicionalmente, el riñón y el bazo presentan una disminución del tamaño y un oscurecimiento de los tejidos (Cipriano *et al.*, 1986; Barnes, 2011).

#### **2.4.6 Hallazgos histopatológicos.**

Al examen histopatológico en general se observa una septicemia general con inflamación y áreas con hemorragias petequiales en muchos órganos, particularmente en riñón, bazo, hígado, corazón, branquias (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011).

En la forma aguda se presenta edema, hiperemia y descamación de las células epiteliales en las lamelas secundarias (Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2009; Barnes, 2011). Asimismo, los mismos autores han observado una dilatación capilar en las lamelas secundarias y una hemorragia difusa tanto en las lamelas primarias como secundarias. Por otro lado, Sierralta *et al.* (2013) y Mateo *et al.* (2016) encontraron la presencia de edema, hiperplasia, teleangiectasia y necrosis en tejido branquial.

Los cambios en el tejido renal incluyen túbulos renales degenerados, glomérulo nefritis y un aumento marcado de melanomacrófagos; sin embargo, otros estudios reportan un aumento de células mesangiales y una disminución importante de células linfoides. Por otro lado en el bazo pueden presentarse áreas focales de necrosis (Tobback *et al.*, 2007, 2009; Barnes, 2011).

Entre los hallazgos reportados en la fase crónica del proceso infeccioso se reportó hiperplasia de las células interlamelares y lamelas primarias, además se observó la variación de las células interlamelares tanto en animales infectados como en animales controles (Tobback *et al.*, 2009). Los autores afirman que esto puede deberse a la calidad del agua que se presentaba durante el estudio; puesto que, no se ha reportado en algún otro estudio este tipo de alteración (Tobback *et al.*, 2007).

A nivel del tejido intestinal, algunos estudios describen necrosis del epitelio del lumen con despredimiento hacia la luz intestinal. Además, congestión en la capa muscular y serosa del intestino, y la presencia de agregados de *Y. ruckeri* (Mahjorr y Akhlaghi, 2012; Sierralta *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2016).

Otros estudios reportan a nivel del tejido hepático, la presencia de necrosis, congestión y necrosis focal con células inflamatorias (Tobback *et al.*, 2009, 2010a, 2010b; Mahjorr y Akhlaghi, 2012). Además, se han observado diferentes tipos de degeneraciones grasas, en donde los hepatocitos se han vuelto pequeños y han desaparecido los espacios sinusoidales, por la presencia de vacuolas discretas en su citoplasma (Tinsley *et al.*, 2010).

En el análisis histopatológico del riñón anterior, se presenta una hiperplasia de tejido hematopoyético en las formas agudas de yersiniosis, sin embargo hay una disminución del mismo en fases crónicas (Tobback *et al.*, 2009; Sierralta *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2016).

Asimismo, Tobback *et al.* (2009) afirman que el aumento de melanomacrófagos en el tejido renal, podría estar asociado a un proceso de respuesta inflamatoria causando cuadros de nefritis crónica. Por otro lado, otros estudios describen en tejido renal, la presencia de degeneración y necrosis eosinofílica tubular, hemorragia, congestión, glomerulonefritis (Avci y Birincioglu, 2005; Mahjor y Akhlaghi, 2012). Adicionalmente, Tinsley *et al.*, 2010 determinan que los túbulos son regenerados con células epiteliales de núcleo basófilo.

#### **2.4.7 Diagnóstico.**

El diagnóstico se puede hacer fácilmente, tomando muestras de bazo, corazón y riñón anterior, los cuales se pueden sembrar en TSA o BHI, incubándolos a 20-25°C por 24 a 48 horas. En estos cultivos se desarrollan colonias cremosas brillosas de *Y. ruckeri*, con un diámetro de 2-3 mm. Otro que medio que se puede utilizar es el medio Shotts-Waltman para aislar y diferenciar aislados de *Y. ruckeri* que hidrolizan el Tween 80 y son sucrosa negativos. Además, para incrementar el número de positivos, se puede utilizar un pre-cultivo, donde los tejidos son suspendidos e incubados en caldo tripticasa de soya a 18°C por 48 horas (Starliper, 2008; Barnes, 2011; Austin y Austin, 2016).

Para la identificación basada en las características bioquímicas se puede utilizar el Api 20E, el cual es usado exitosamente. Sin embargo, hay que tener cuidado, ya que algunos estudios reportan que los resultados podrían confundirse *Hafnei alvei*. Adicionalmente se podría ELISA indirecto para la detección de *Y. ruckeri* (Cossarini-Dunier *et al.*, 1988; Barnes, 2011; Austin y Austin, 2016).

Otro método efectivo para diagnosticar *Y. ruckeri* es la citología. En el caso de los peces, estos tienen un riñón de consistencia frágil, para el cual se realiza una aspiración del tejido ingresando a nivel del último arco branquial en una dirección dorso-caudal. Cada aspiración efectuada se tiene que confirmar mediante un análisis microscópico, donde observa la presencia de melanomacrófagos, los cuales son característicos del tejido renal (Noga *et al.*, 1988). La especificidad y la sensibilidad para esta técnica de diagnóstico fueron de 93 % y 88 %, respectivamente, a diferencia del cultivo de tejido renal obtenido por necropsia, el cual fue más bajo (Noga *et al.*, 1988).

En el diagnóstico por medio de técnicas moleculares, el método de PCR descrito por Gibello *et al.* (1999), tiene como ventaja tener la capacidad de detectar *Y. ruckeri* en muy bajos niveles y además tiene posibilidad de detectar portadores asintomáticos. Por otro lado, Altinok *et al.* (2001) desarrolló un PCR para detectar *Y. ruckeri* en muestras de sangre de truchas arcoíris. Asimismo, se ha desarrollado una técnica de PCR múltiple, en la cual se ha encontrado una alta sensibilidad y especificidad, pudiendo detectar a las bacterias en

concentraciones de 0.6, 6 y 27 UFC, para *Flavobacterium psychrophylum*, *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*, respectivamente (Del Cerro *et al.*, 2002).

#### **2.4.8 Control y Prevención.**

##### **2.4.8.1 Uso de antibióticos.**

Para el tratamiento de la yersiniosis, así como en otras enfermedades bacterianas en acuicultura, se suelen aplicar rutinariamente un limitado espectro de antibióticos como: amoxicilina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, sulfametoxazol/trimetropin, y últimamente florfenicol. (Alderman y Hastings, 1998; Michel *et al.*, 2003). Mosquito *et al.* (2011) señalan que las enterobacterias a nivel mundial son altamente resistentes hacia trimetropin/sulfametoxazol, tetraciclinas, algunos fenicoles, quinolonas y beta lactámicos. Entre los diferentes mecanismos de resistencia bacteriana tenemos mutaciones en el ADN por transposones y/o integrones que alteran genes blancos del antibiótico; destrucción o inactivación de antimicrobianos por enzimas; expulsión por bombas de eflujo específicas; conjugación mediadas por plásmidos; transformación por ADN libres; y transducción por bacteriófagos (Stock *et al.*, 2002; Pérez y Robles, 2013; Kumar *et al.*, 2015).

En algunos países de Europa se han realizado diversos estudios sobre resistencia antibiótica en *Y. ruckeri*, por los métodos de concentración mínima inhibitoria y sensibilidad frente a discos de antibióticos; y análisis y caracterización molecular de los genes de resistencia mediante PCR, demostrando el desarrollo de resistencia contra ácido oxolínico, amoxicilina, florfenicol, oxitetraciclina, sulfametoxazol/trimetropin, entre otros (Rodgers, 2001, Michel *et al.*, 2003; Defoirdt *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2013, Altun *et al.*, 2013).

En el Perú, Bueno (2012) realizó un estudio en el Centro Piscícola “El Ingenio” – Junín, con el objetivo de identificar fenotípica y molecularmente cepas de *Yersinia ruckeri*, además de realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana, evidenciando que el ácido oxolínico y la tetraciclina presentaron mayor resistencia, con un 26,67% en ambos casos. Por último, se aislaron cepas de *Y. ruckeri* de alevines de truchas arcoíris cultivadas en el lago Titicaca, presentando estas mediana susceptibilidad al florfenicol y oxitetraciclina, los cuales son los antibióticos más utilizados en la truchicultura regional (Sandoval *et al.*, 2016).

Finalmente, Welch *et al.* (2007) indican que el incremento de la resistencia antimicrobiana en diversas especies de enterobacterias, se debe a la adquisición de plásmidos con genes de resistencia (conjugación) entre diversos géneros y especies que comparten un mismo medio, como sucede en el género *Yersinia*, incluyendo a *Yersinia ruckeri*, lo cual podría traer altos riesgos para la salud animal y humana si no se toman medidas de prevención y control.

#### **2.4.8.2 Probióticos.**

La preocupación por el desarrollo de resistencia a antibióticos en la acuicultura ha motivado la investigación en métodos alternativos para el control de bacterias patógenas, utilizando bacterias y levaduras probióticas benéficas (Irianto y Austin, 2002). En un estudio se ha demostrado que la administración por vía oral de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, protegen a las truchas arcoíris contra infecciones. Los autores determinaron que esta protección es debido a que estas bacterias producen secreciones antimicrobianas o producen un efecto inmunoestimulante (Raida *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2015).

Los alimentos suplementados con *Carnobacterium maltaromaticum* B26 y *Carnobacterium divergens* aislados de la microbiota normal de truchas arcoíris, produjeron una buena protección contra infecciones de *Y. ruckeri* (Robertson *et al.*, 2000). Posteriores estudios confirmaron que esta protección se logra más por una buena estimulación del sistema inmune en el hospedero que por el efecto antimicrobiano propio de las bacterias (Kim y Austin, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que *Lactobacillus lactis* es un antagonista de *Y. ruckeri* y, como también sucede con *Lactobacillus fermentum*, reducen significativamente la adhesión del patógeno al mucus del pez (Balcazar *et al.*, 2008). Sica *et al.* (2012), reportaron resultados similares al estudiar 12 bacterias ácido lácticas, encontrando que un 60% de ellas desplegó a *Y. ruckeri* por exclusión competitiva.

Recientemente, se reportó que la alimentación de peces con una dieta basada en plantas modificó la composición de la microflora intestinal, lo cual afectó la respuesta inmune frente a *Y. ruckeri*, sugiriendo un efecto prebiótico (Ingerslev *et al.*, 2014).

#### **2.4.8.3 Vacunación.**

Las grandes pérdidas en los cultivos de salmónidos pueden ser controladas mediante vacunación. La enfermedad de la boca roja fue uno de las primeras enfermedades para la cual se desarrolló una vacuna comercial efectiva (Barnes, 2011). Las vacunas contra yersiniosis son monovalentes, las cuales son suspensiones inactivadas de la célula entera de *Y. ruckeri* serotipo O1 biotipo 1, siendo administradas por vía oral, intraperitoneal o por inmersión y otorgando buenos niveles de protección contra la enfermedad en del biotipo 1 (Raida y Buchmann, 2008; Costa *et al.*, 2011; Soltani *et al.*, 2014).

Se han desarrollado nuevas vacunas utilizando la proteasa Yrp1, el gen *aroA*, productos extracelulares y lipopolisacáridos, los cuales han conferido una buena protección contra cepas del biotipo 1 de *Y. ruckeri* (Temprano *et al.*, 2005; Ispir y Dorucu, 2010). Sin



embargo, las cepas del biotipo 2 de *Y. ruckeri* son más difíciles de combatir y son las responsables por brotes recientes de enfermedades en peces que fueron vacunados contra cepas del biotipo 1, esto quiere decir que las vacunas monovalentes del biotipo 1 fallan al inducir una protección contra infecciones de cepas del biotipo 2 (Austin *et al.*, 2003). Por otra parte, una vacuna ha sido desarrollada usando cepas del biotipo 1 y 2 de *Y. ruckeri* inactivadas por formalina confiriendo una buena protección contra las cepas de ambos biotipos (Tinsley *et al.*, 2011; Deshmukh *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015).

Tobback *et al.* (2009) demostraron la eliminación de *Yersinia ruckeri* en las células epiteliales branquiales, la cual se realizó en un ensayo in vitro con Salmón atlántico mediante la exposición a formalina por baños de inmunización. Sin embargo, la estimulación de protección específica en peces mediante este método no ha obtenido una efectividad esperada. Además, los métodos de inmunización por inmersión o inyección intraperitoneal conllevan a una situación de estrés, generando consecuencias negativas metabólicas en los peces (Siwicki *et al.*, 2001).

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Tipo y lugar de estudio**

El estudio fue de tipo experimental, descriptivo, longitudinal y prospectivo. La preparación de los inóculos bacterianos, los aislamientos bacteriológicos y lectura de láminas histopatológicas se realizó en la Sección Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La crianza de los alevines de truchas arcoíris, inoculación de los mismos y desarrollo del estudio de patogenicidad *per se*, fueron desarrollados en la Unidad de Cultivo Experimental del Laboratorio de Biología Acuática y Acuicultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

#### **3.2 Animales de estudio**

Se trabajaron con 200 alevines de trucha arcoíris, aparentemente sanos con un peso promedio de  $7.25 \pm 2.10$  g y talla promedio de  $6.8 \pm 1.2$  cm, los cuales se adquirieron de una piscigranja que no presentaba reporte alguno de enfermedad. Los animales fueron transportados en grandes bolsas plásticas de 60 litros en tanques con geles refrigerantes, las bolsas fueron llenadas una tercera parte con agua y los otros dos tercios restantes completados con oxígenos puros y sellados herméticamente. Posteriormente los peces fueron trasladados a la Unidad de Cultivo Experimental del Laboratorio de Biología Acuática y Acuicultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Previo al inicio del experimento los peces fueron mantenidos por una semana en un estanque circular de 500 L, con aireación, sistema de filtración y sistema de enfriamiento del agua constantes. Durante este periodo se efectuó una revisión sanitaria, para la cual se tomó

una muestra al azar de 20 alevines, con el propósito de descartar la presencia de *Yersinia ruckeri*. Para esto, los peces se sacrificaron mediante sobredosis de eugenol a dosis de 3 ml/L de agua y posterior corte medular, método de eutanasia recomendado por la CCAC (2010). Luego se procedió a realizar la necropsia para cada pez, según la metodología descrita por Meyers (2009), la cual consistió primero en la examinación y registro de lesiones externas. Luego se puso al pez sobre su lado derecho y se desinfectó su superficie con alcohol 70°. Se desinfectaron tijeras y pinzas con alcohol de 96°, y se pasaron por la flama de un mechero bunsen haciendo que el alcohol se encienda y queme, repitiendo esta acción una o dos veces, limpiando los instrumentos de cualquier material orgánico. El ingreso a la cavidad abdominal se hizo tirando de la aleta pectoral con pinzas estériles mientras se cortaba la pared abdominal, en la base de la aleta pectoral, con un par de tijeras pequeñas y estériles. El corte se continuó dorsalmente hasta justo debajo de la línea lateral hasta encontrar resistencia. Se comenzó de nuevo en la base de la aleta pectoral, y se continuó la incisión hacia la parte posterior del pez a lo largo de la pared abdominal ventral hasta el orificio anal. Después, desde el orificio anal se continuó dorsalmente hasta justo debajo de la línea lateral y para seguir cortando en dirección anterior hasta conectar con la primera incisión, se retiró el colgajo de tejido abdominal, exponiendo así las vísceras internas y la cavidad. Los instrumentos se limpiaron del material orgánico, y se flamearon repetidamente durante este procedimiento. Posteriormente se hizo la examinación visual de las vísceras para el registro de lesiones internas. Para el análisis microbiológico, se tomaron y sembraron por estriado muestras asépticas de riñón anterior y bazo de cada alevín en placas con agar tripticasa de soya (TSA), siendo estas incubadas a 25°C por 24-48 horas. No se encontraron lesiones externas o internas en los peces muestreados y tampoco se registró crecimiento bacteriano alguno.

### **3.3 Condiciones de crianza**

Se utilizaron 5 acuarios de plástico de 30 l con aireación constante, cada acuario era independiente de los demás y no compartían sistema de recirculación de agua o filtros. Diariamente se realizaban cambios parciales del agua (30%) con agua declorada y acondicionada mediante enfriadores del agua. Se brindó alimento comercial en cantidad de 3% de su peso vivo. Además fueron evaluadas las constantes físico-químicas del agua durante el experimento (Cuadro 9).

Cuadro 9. *Parámetros físico-químicos del agua durante el presente estudio, 2015*

Parámetro	Valor promedio
Temperatura	15.68± 0.55°C
pH	8.53±0.26
Oxígeno disuelto	8.17 ppm
Amoniaco-nitrógeno	3.24 ppm
Nitrito-nitrógeno	0.09 ppm

### 3.4 Cepa desafío y preparación del inóculo

Para la inoculación, se utilizó una cepa de *Y. ruckeri* procedente de Huaraz, la cual fue aislada de un brote de yersiniosis en truchas arcoíris, y que produjo una mortalidad alta (> 80%) en una piscigranja. La cepa fue mantenida en ceparios con agar BHI a -20°C; para la preparación de los inóculos, esta cepa fue transferida a TSB (caldo de tripticasa de soya) e incubados a 25°C por 24 h, para luego ser sembrados en TSA (agar de tripticasa de soya) y mantenidos a las mismas condiciones, las colonias características se utilizaron para preparar diluciones bacterianas en PBS estéril, hasta obtener las concentraciones requeridas para el presente estudio.

### 3.5 Diseño experimental

Los animales fueron distribuidos al azar en cinco grupos experimentales de 20 peces cada uno, un grupo control y cuatro retados; los cuales fueron inoculados, previa anestesia con eugenol a 1.5 ml/l, con un cultivo puro de *Y. ruckeri* suspendido en PBS en las concentraciones descritas en el Cuadro 10, medido según escala de Mc Farland a diluciones sucesivas. El grupo control fue inoculado con PBS. Se inyectó 0.1 ml de las concentraciones mencionadas por vía intramuscular, debajo de la aleta dorsal, usando jeringas de tuberculina estéril para cada aplicación. Los peces se observaron diariamente durante 12 días.

Cuadro 10. *Distribución de grupos experimentales y diluciones de las cepas de Yersinia ruckeri provenientes de Huaraz inoculadas por vía intramuscular, 2015*

Grupo	Número de peces	Inoculación	Dosis
Control	20	PBS	0.1 ml
G1	20	<i>Y. ruckeri</i>	0.1 ml de $1 \times 10^4$ /ml
G2	20	<i>Y. ruckeri</i>	0.1 ml de $4 \times 10^4$ /ml
G3	20	<i>Y. ruckeri</i>	0.1 ml de $1 \times 10^8$ /ml
G4	20	<i>Y. ruckeri</i>	0.1 ml de $4 \times 10^8$ /ml

### 3.6 Evaluación de patogenicidad

Se registraron los signos clínicos, lesiones externas e internas que presentaban los peces durante 12 días post inoculación con *Y. ruckeri*. Además se determinaron las morbilidades y mortalidades para cada uno de los cinco grupos experimentales.

### 3.7 Aislamiento e identificación de *Y. ruckeri*

Los peces moribundos con signos clínicos compatibles con Yersiniosis se eutanasiaron con eugenol a dosis de 3 ml/l, o en caso de peces recientemente muertos (lapso máximo una hora) se realizaba un examen externo visual para identificar lesiones y luego se desinfectaba la superficie del pez con alcohol al 70%. Posteriormente se les realizaba corte medular, método de eutanasia recomendado por la CCAC (2010), y se procedió a realizar la necropsia descrita anteriormente, según la metodología por Meyers (2009). Luego se tomaron muestras asépticas de bazo y riñón, las cuales se incubaron por 24-48 h a 25°C en TSA. En caso de crecimiento de colonias, se observaron y registraron sus características tales como forma, tamaño, crecimiento, bordes y color, las colonias presuntivas de ser *Y. ruckeri* se les realizó tinción de Gram, prueba de oxidasa, catalasa y motilidad, esto con el fin de relacionar la causa de muerte directamente a *Y. ruckeri*. La confirmación de los resultados microbiológicos e histopatológicos fue realizada mediante PCR convencional basado en el protocolo desarrollado por Del Cerro *et al.* (2002), utilizando cebadores específicos que identifican un segmento de 575 pares de bases (pb) correspondientes al gen del ribosoma 16S de *Yersinia ruckeri*. Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la realización del PCR se utilizó el kit comercial GoTaq Green Master Mix (Promega, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo N°1). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis, utilizando gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X, sometidos a campo eléctrico de 90 voltios durante 60-90 minutos. Al finalizar el experimento la totalidad de animales fueron sacrificados y las instalaciones desinfectadas con cloro.

### 3.8 Estudio histopatológico

Para la caracterización histológica de lesiones producidas por la cepa de *Yersinia ruckeri* procedente de Huaraz, se colectaron y fijaron en formol al 10%, tejidos de intestinos, riñón, bazo, músculo, hígado y branquias de los peces moribundos y muertos, para posteriormente ser procesados mediante el método histológico convencional del laboratorio (Anexo N° 2).

### 3.9 Consideraciones éticas

El uso de eugenol, es un método anestésico muy usado para la toma de muestras de peces enfermos (Ross y Ross, 2008), la cual se realiza con baños de inmersión de 20-30 segundos para evitar sufrimiento animal de acuerdo al Comité de Ética y Bienestar Animal de la FMV - UNMSM.

### 3.10 Análisis de datos de las lesiones histopatológicas

Las lesiones fueron clasificadas por cada órgano, según lo propuesto por Reimschuessel *et al.* (1992) (Cuadro 11). Estas lesiones fueron clasificadas de acuerdo al grado de afección por su extensión, y para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un análisis de frecuencia, indicando el porcentaje de cada variable con respecto al total de población analizada.

Cuadro 11. *Clasificación de la lesión según el grado de afección por su extensión*

Grado	Extensión de la lesión
I	Escasa presencia de la lesión, hasta 25% aproximadamente de toda la muestra.
II	Leve presencia de la lesión por encima de 25% hasta 50% aproximadamente de toda la muestra
III	Moderada presencia de la lesión, por encima del 50% hasta 75% aproximadamente de toda la muestra.
IV	Severa presencia de la lesión, por encima de 75% hasta aproximadamente el 100% de toda la muestra.

Fuente: Reimschuessel *et al.*, 1992

Además de categorizar la degeneración grasa en el hígado (Cuadro 12).

Cuadro 12. *Clasificación de la degeneración grasa de acuerdo a severidad y extensión*

Grado	Severidad	Extensión
I	Escasa presencia de microvacuolas intracitoplasmáticas.	Multifocal, hasta 25% aproximadamente de toda la muestra.
II	Leve presencia de micro y/o macrovacuolas intracitoplasmáticas.	Multifocal, por encima de 25% hasta aproximadamente 50% de toda la muestra.
III	Moderada presencia de macro y microvacuolas intracitoplasmáticas.	Difuso, por encima de 50% hasta aproximadamente 75% de toda la muestra.
IV	Severa presencia de macrovacuolas intracitoplasmáticas.	Difuso, por encima de 75% hasta aproximadamente 100% de toda la muestra
<b>I: Escaso; II: Leve; III: Moderado; IV: Severo</b>		

Fuente: Reimschuessel *et al.*, 1992

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Signos clínicos y lesiones externas e internas

Los signos clínicos (Cuadro 13) con mayor frecuencia registrados fueron anorexia (90%) y melanosis (76%), estos aparecieron a las 12 horas post inoculación (Cuadro 14) para los grupos G3 y G4, y al 3° día post inoculación (dpi) para los grupos G1 y G2; a las 24 horas se le sumaron letargia y nado errático para los grupos G3 y G4, y al 4° dpi para los grupos G1 y G2, además se observaron exoftalmia, abdomen abultado y orillamiento (Anexo N° 3).

A la necropsia, las lesiones externas e internas que más se observaron fueron esplenomegalia (86%), contenido mucoso en intestino (80%), congestión intestinal (60%) y hemorragias en boca (50%); y las de menor frecuencia fueron vejiga natatoria hemorrágica (31%), congestión hepática (29%) y petequias en hígado (21%) (Cuadro 15).

### 4.2 Mortalidades

Las mortalidades de las truchas arcoíris inoculadas con *Yersinia ruckeri* se iniciaron al 2 dpi para los grupos G3 y G4; y a los 7 dpi para G1 y G2. Una vez finalizado el estudio, se obtuvo una mortalidad total del 0% para el grupo control, 65% para el G1, 60% para el G2 y de 100% para los G3 y G4 (Cuadro 16).

Cuadro 13. *Frecuencia de signos clínicos en los grupos experimentales inoculados con Yersinia ruckeri durante el estudio, 2015*

Signos clínicos	G1	G2	G3	G4	Total casos	Total animales	Frecuencia (%)
Anorexia	18	17	18	19	67	80	<b>90</b>
Melanosis	14	15	15	17	61	80	<b>76</b>
Letargia	10	11	13	13	47	80	<b>59</b>
Exoftalmia	9	10	12	13	44	80	<b>55</b>
Abdomen dilatado	7	8	10	10	35	80	<b>44</b>
Nado errático	5	5	8	9	27	80	<b>34</b>
Orillamiento	5	4	6	6	21	80	<b>26</b>

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Cuadro 14. *Índice de morbilidad de los grupos experimentales inoculados con Y. ruckeri durante el estudio, 2015*

GRUPOS EXPERIMENTALES					
DÍA	C	G1	G2	G3	G4
<b>1</b>	-	-	-	7	9
<b>2</b>	-	-	-	8	9
<b>3</b>	-	3	3	5	2
<b>4</b>	-	5	2	-	-
<b>5</b>	-	4	5	-	-
<b>6</b>	-	3	6	-	-
<b>7</b>	-	4	2	-	-
<b>8</b>	-	1	3	-	-
<b>9</b>	-	-	-	-	-
<b>10</b>	-	-	-	-	-
<b>11</b>	-	-	-	-	-
<b>12</b>	-	-	-	-	-
TOTAL	0	20	20	20	20
MORBILIDAD	0%	100%	100%	100%	100%

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$



Cuadro 15. *Frecuencia de lesiones externas e internas en los grupos experimentales inoculados con Y. ruckeri durante el estudio, 2015*

<b>Lesiones internas y externas</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>Total casos</b>	<b>Total peces necropsiados</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Esplenomegalia	16	15	18	18	67	80	<b>84</b>
Contenido mucoso en intestino	15	13	18	18	64	80	<b>80</b>
Congestión intestinal	11	13	12	12	48	80	<b>60</b>
Hemorragias en boca	8	9	11	12	40	80	<b>50</b>
Petequias en músculo y tejido graso	8	7	10	13	38	80	<b>48</b>
Palidez hepática	6	9	11	12	38	80	<b>48</b>
Hemorragia ocular	10	10	6	8	34	80	<b>43</b>
Palidez branquial	7	7	8	8	30	80	<b>38</b>
Vejiga natatoria hemorrágica	7	7	6	5	25	80	<b>31</b>
Congestión hepática	8	6	5	4	23	80	<b>29</b>
Petequias en hígado	4	6	4	3	17	80	<b>21</b>

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Cuadro 16. *Índice de mortalidad de los grupos experimentales inoculados con Y. ruckeri durante el estudio, 2015*

<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>						
<b>DÍA</b>	<b>C</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	
<b>1</b>	-	-	-	-	-	
<b>2</b>	-	-	-	11	10	
<b>3</b>	-	-	-	5	8	
<b>4</b>	-	-	-	1	2	
<b>5</b>	-	-	-	2	-	
<b>6</b>	-	-	-	1	-	
<b>7</b>	-	1	1	-	-	
<b>8</b>	-	1	4	-	-	
<b>9</b>	-	3	3	-	-	
<b>10</b>	-	7	2	-	-	
<b>11</b>	-	1	1	-	-	
<b>12</b>	-	-	1	-	-	
<b>TOTAL</b>	0	13	12	20	20	
<b>MORTALIDAD</b>	0%	65%	60%	100%	100%	

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

### 4.3 Confirmación mediante PCR

La prueba de PCR convencional evidenció la amplificación de un producto específico de 575 pb, correspondiente a *Y. ruckeri* (Fig. 3) en las muestras analizadas, considerándose de esta manera como muestras positivas.

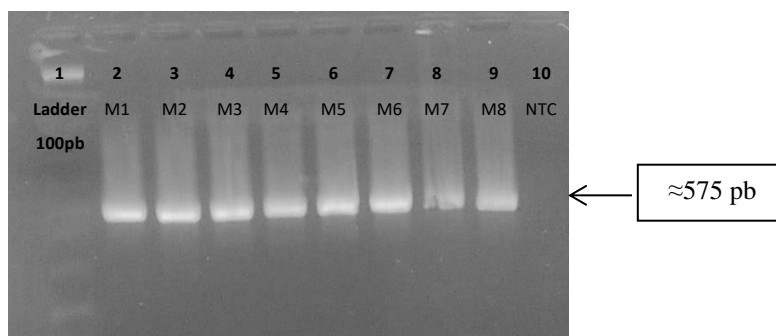


Figura 3. Electroforesis de producto de PCR de aislados de *Y. ruckeri*, 2015. Carril 1: Ladder 100 pb; carril 2-8: aislados (M1-M7); carril 9: control positivo; carril 10: control negativo (NTC).

### 4.4 Lesiones histopatológicas

Se analizaron mediante histopatología muestras de bazo, riñón anterior, intestino, hígado, branquias y músculo de 25 truchas arcoíris.

Los hallazgos encontrados en el hígado fueron degeneración grasa en un 100% (25/25), necrosis 80% (20/25), congestión en un 76% (19/25), presencia de melanomacrófagos 20% (5/25), presencia de bacterias extravasculares 4% (1/25), y separación de hepatocitos en un 4% (1/25) (Cuadro 17).

Cuadro 17. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia relativa en hígado de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5	Frecuencia (%)
Degeneración grasa	5	5	5	5	5	100
Necrosis	0	5	5	5	5	80
Congestión	0	5	4	5	5	76
Melanomacrófagos	0	2	1	1	1	20
Presencia de bacterias	0	0	0	0	1	4
Separación de hepatocitos	0	1	0	0	0	4

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La degeneración grasa (Figura 4A) se presentó en los cinco grupos, encontrándose desde escasa a severa intensidad, predominando una moderada intensidad en el grupo control y el grupo experimental G4 (Cuadro 18).

Cuadro 18. *Frecuencia relativa y absoluta de degeneración grasa en hígado en los grupos experimentales y control, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	0	0	0	0	0
Escaso	0	2	1	0	0
Leve	2	2	3	2	2
Moderado	3	1	1	1	3
Severo	0	0	0	2	0
<b>Frecuencia (%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La necrosis hepática (Figura 4A) se presentó en las veinte muestras de los cuatro grupos experimentales, siendo de escasa a severa intensidad. El grupo experimental  $1 \times 10^8$  (G3) presentó cuatro individuos con moderada intensidad y un individuo con severo grado de presentación, siendo el grupo con mayor grado de presentación de la lesión (Cuadro 19).

Cuadro 19. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en hígado en los grupos experimentales y control, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	0	0	0	0
Escaso	0	2	0	0	1
Leve	0	3	4	0	2
Moderado	0	0	1	4	1
Severo	0	0	0	1	1
<b>Frecuencia (%)</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Se observó la presencia de melanomacrófagos (Figura 4A) en los cuatro grupos experimentales siendo de escasa a leve presentación, encontrándose en los grupos G3 ( $1 \times 10^8$ ) y G4 ( $4 \times 10^8$ ), un caso para cada grupo en el grado de leve como el mayor grado de presentación (Cuadro 20).

Cuadro 20. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de melanomacrófagos en hígado en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	3	4	4	4
Escaso	0	2	1	0	0
Leve	0	0	0	1	1
Moderado	0	0	0	0	0
Severo	0	0	0	0	0
<b>Frecuencia (%)</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

En los cuatro grupos experimentales se presentó congestión hepática (Figura 4B), siendo de escaso a moderado grado de presentación. Los grupos G3 ( $1 \times 10^8$ ) y G4 ( $4 \times 10^8$ ) fueron los más afectados con cuatro individuos cada uno con una moderada presentación de la lesión (Cuadro 21).

Cuadro 21. *Frecuencia relativa y absoluta de congestión en hígado en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	0	1	0	0
Escaso	0	1	1	1	0
Leve	0	3	2	0	1
Moderado	0	1	1	4	4
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	100	80	100	100

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de bacterias extravasculares, se identificó en sólo una muestra del grupo G4 ( $4 \times 10^8$ ) con leve intensidad de presentación. Además, el grupo experimental G1 ( $1 \times 10^4$ ) fue el único que presentó un caso de separación de hepatocitos (Figura 4B) de moderada intensidad.

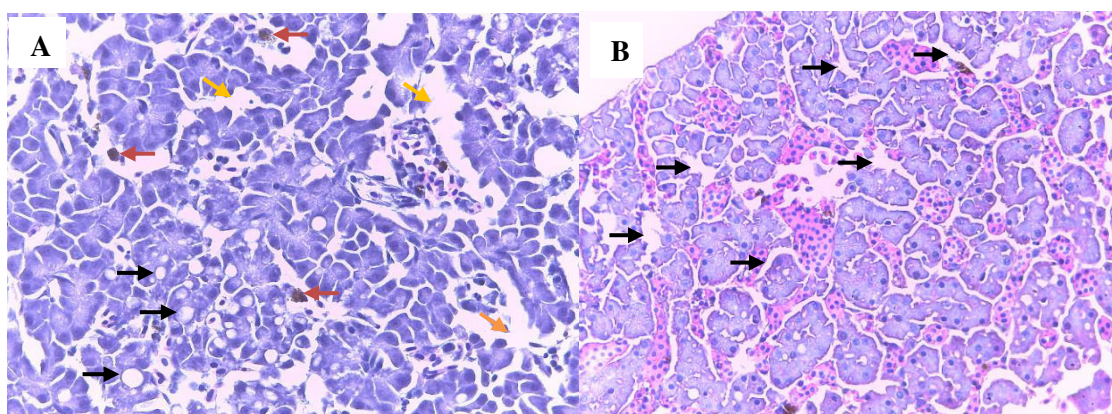


Figura 4. Cortes histológicos de hígado de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*. A: Necrosis (flechas naranjas) con degeneración grasa (flechas negras) y presencia de melanomacrófagos (flechas rojas). B: Congestión con separación de hepatocitos (flechas negras). H-E. 400X

A nivel del bazo, se identificaron siete hallazgos histopatológicos como congestión 80% (20/25), presencia de melanomacrófagos 80% (20/25) y de bacterias 16% (4/25), dilatación de vasos sanguíneos 12% (3/25), disminución linfoide 8% (2/25) y linfocitos lisados 8% (2/25) (Cuadro 22).

Cuadro 22. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en bazo de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5	Frecuencia (%)
Congestión	0	5	5	5	5	80
Melanomacrófagos	0	5	5	5	5	80
Bacterias	0	1	1	1	1	16
Dilatación de vasos sanguíneos	0	0	0	1	2	12
Necrosis	0	1	2	0	0	12
Disminución Linfoide	0	1	1	0	0	8
Linfocitos lisados	0	1	0	0	1	8

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La congestión esplénica (Figura 5A) se identificó en todos las muestras de los cuatro grupos experimentales, siendo de leve a moderada intensidad. El grupo G4 presentó todas sus muestras con moderada intensidad de presentación, a diferencia de los demás grupos (Cuadro 23).

Cuadro 23. *Frecuencia relativa y absoluta de congestión en bazo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	0	0	0	0
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	1	1	2	0
Moderado	0	4	4	3	5
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	100	100	100	100

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de melanomacrófagos (Figuras 5A) se observó en todas las muestras de los cuatro grupos experimentales observándose de escasa a moderada intensidad de presentación. Los grupos G3 y G4 fueron los más afectados con cuatro muestras de intensidad moderada para cada uno (Cuadro 24).

Cuadro 24. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de melanomacrófagos en bazo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	0	0	0	0
Escaso	0	1	1	0	0
Leve	0	2	2	1	1
Moderado	0	2	2	4	4
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	100	100	100	100

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de bacterias en bazo se pudo identificar en sólo un individuo de cada grupo experimental (Cuadro 25), siendo de grado leve para todos los casos.

Cuadro 25. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de bacterias en bazo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	4	4	4	4
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	1	1	1	1
Moderado	0	0	0	0	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	20	20	20	20

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La dilatación de vasos en bazo (Figura 5B) se observó en los grupos G3 y G4, siendo de moderado a severo grado de presentación. El grupo G4 fue el más afectado con un individuo de grado severo (Cuadro 26).

Cuadro 26. *Frecuencia relativa y absoluta de dilatación de vasos sanguíneos en bazo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	5	5	4	3
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0
Moderado	0	0	0	1	1
Severo	0	0	0	0	1
Frecuencia (%)	0	0	0	20	40

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La necrosis en bazo (Figura 5B) se observó en los grupos G1 y G2, siendo de leve a moderado grado de presentación. El grupo G2 fue el más afectado con un individuo de grado moderado (Cuadro 27).

Cuadro 27. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en bazo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	4	3	5	5
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	1	1	0	0
Moderado	0	0	1	0	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	20	40	0	0

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de linfocitos lisados (Figura 5C) sólo se pudo observar en una muestra del grupo experimental G1, y en una muestra del grupo G4, siendo de intensidad moderada de presentación para el grupo G1 y de grado severo para el otro (Cuadro 28).

Cuadro 28. *Frecuencia relativa y absoluta de linfocitos lisados en bazo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	4	5	5	4
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0
Moderado	0	1	0	0	0
Severo	0	0	0	0	1
Frecuencia (%)	0	20	0	0	20

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Se identificó disminución linfoide en bazo (Figura 5C), en sólo una muestra de cada grupo experimental de concentraciones de  $1 \times 10^4$ /ml y  $4 \times 10^4$ /ml, en moderado grado de presentación para ambos. (Cuadro 29).

Cuadro 29. *Frecuencia relativa y absoluta de disminución linfoide en bazo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	0	0	0	0	0
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0
Moderado	0	1	1	0	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	20	20	0	0

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

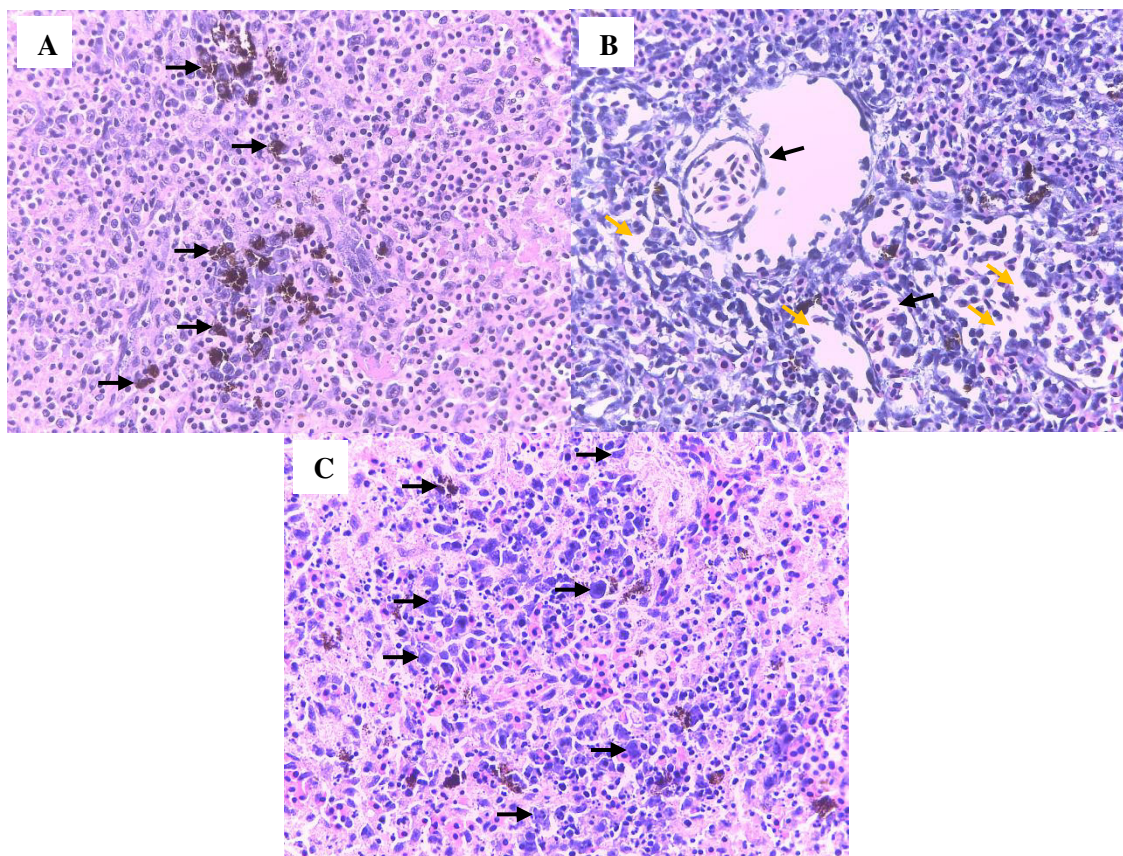


Figura 5. Cortes histológicos de bazo de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*. A: Congestión con presencia de melanomacrófagos (flechas negras). B: Dilatación de vasos sanguíneos (flechas negras) con zonas de necrosis (flechas naranjas). C: Disminución linfoide con linfocitos lisados (flechas negras). H-E. 400X

En el riñón anterior se observaron presencia de melanomacrófagos en un 60% (15/25), túbulos regenerados 28% (7/25), necrosis 24% (6/25), disminución linfoide 24% (6/25), gotas hialinas en epitelio tubular 16% (4/25), aumento de tejido linfoide 8% (2/25), presencia de bacterias 8% (2/25), congestión 8% (2/25) y linfocitólisis 4% (1/25) (Cuadro 30).

Cuadro 30. Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en riñón anterior de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con *Y. ruckeri*, 2015

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5	Frecuencia (%)
Melanomacrófagos	2	4	2	4	3	60
Túbulos regenerados	2	2	0	2	1	28
Disminución linfoide	0	0	0	3	3	24
Necrosis	0	2	0	2	2	24
Gotas hialinas en epitelio tubular	1	3	0	0	0	16
Aumento de tejido linfoide	0	0	2	0	0	8
Bacterias	0	1	0	0	1	8
Congestión	0	0	0	0	2	8
Linfocitólisis	0	1	0	0	0	4

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$



La presencia de melanomacrófagos en riñón anterior (Figura 6A) se pudo observar en todos los grupos, registrándose de leve a severo grado de presentación (Cuadro 31).

Cuadro 31. *Frecuencia relativa y absoluta de melanomacrófagos en riñón anterior en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	3	1	3	1	2
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	2	2	0	3	1
Moderado	0	2	1	0	2
Severo	0	0	1	1	0
Frecuencia (%)	40	80	40	80	60

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de túbulos regenerados (Figura 6A) se pudo identificar en casi todo los grupos, menos en el grupo G2, siendo de leve a moderado grado de presentación (Cuadro 32).

Cuadro 32. *Frecuencia relativa y absoluta de túbulos regenerados en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	3	3	5	3	4
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	2	1	0	2	1
Moderado	0	1	0	0	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	40	40	0	40	20

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Disminuciones linfoides en riñón anterior (Figura 6A) se registraron en los grupos G3 y G4, siendo de leve a moderada intensidad de presentación en tres muestras para cada grupo (Cuadro 33).

Cuadro 33. *Frecuencia relativa y absoluta de disminución linfoide en riñón en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	5	5	2	2
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	2	2
Moderado	0	0	0	1	1
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	0	0	60	60

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Los grupos experimentales G1, G3 y G4, presentaron dos muestras cada uno con necrosis renal anterior (Figura 6B), en grado moderado a severo (Cuadro 34).

Cuadro 34. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en riñón anterior en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	3	5	3	3
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0
Moderado	0	1	0	0	1
Severo	0	1	0	2	1
Frecuencia (%)	0	40	0	40	40

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de gotas hialinas en riñón anterior (Figura 6B) se observó en los grupos control y G1, con una presentación de escasa a moderada intensidad, siendo el más afectado, el grupo G1 con el 60% de frecuencia de las muestras (Cuadro 35).

Cuadro 35. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de gotas hialinas en riñón en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	4	2	5	5	5
Escaso	1	2	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0
Moderado	0	1	0	0	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	20	60	0	0	0

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de bacterias en riñón anterior se observó en dos muestras. Una muestra de moderado grado para el grupo G1, y una muestra de leve intensidad para el grupo G4 (Cuadro 36).

Cuadro 36. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de bacterias en riñón en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	4	5	5	4
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	1
Moderado	0	1	0	0	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	20	0	0	20

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

El aumento de tejido linfoide en riñón anterior sólo se pudo identificar en dos muestras del grupo G2 ( $4 \times 10^4$ ), ambas en moderado grado de presentación (Fig. 6C). Adicionalmente, en el grupo G4 ( $4 \times 10^8$ ) se identificaron dos muestras con congestión del riñón anterior, una en grado leve y la otra en grado moderado (Fig. 6C). Por último, sólo se identificó una muestra con linfocitolisis de moderada intensidad para el grupo G1 ( $1 \times 10^4$ ) (Fig. 6C).

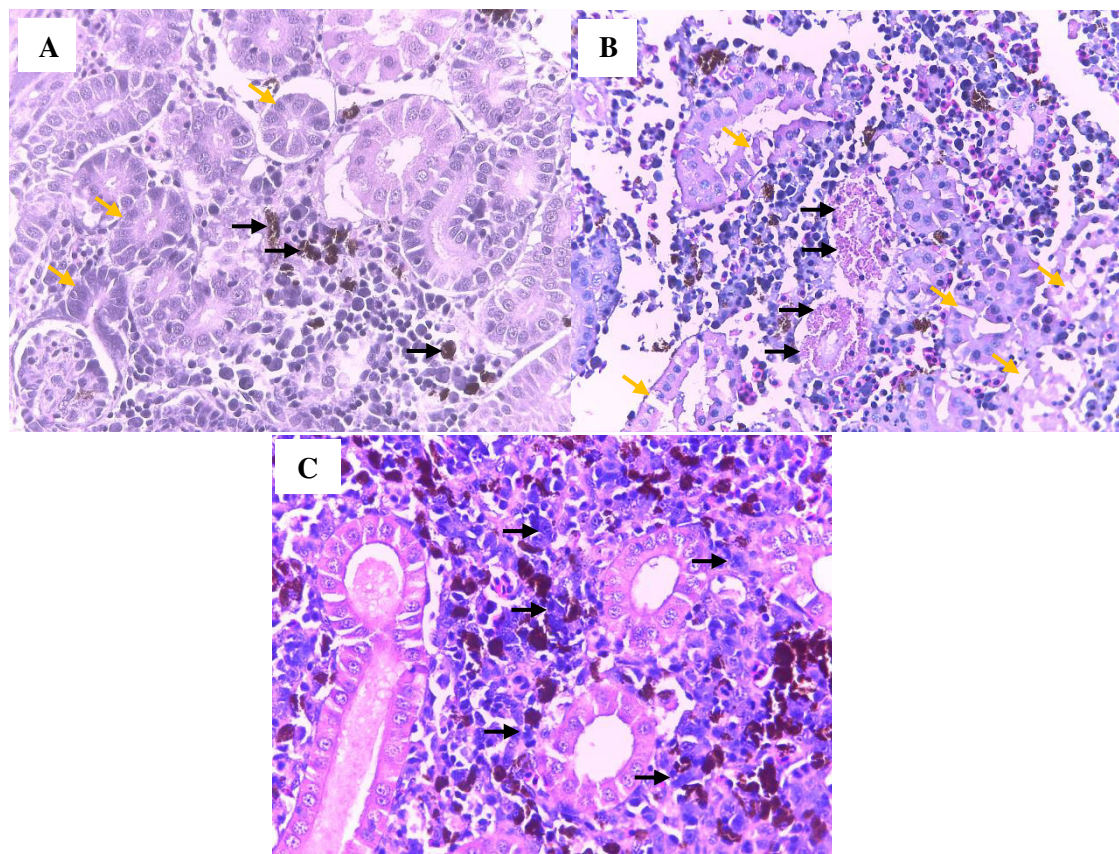


Figura 6. Cortes histológicos de riñón de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*. A: Disminución de tejido linfoide con regeneración tubular (flechas naranjas) y presencia de melanomacrófagos (flechas negras). B: Necrosis tubular (flechas naranjas) con presencia de gotas hialinas (flechas negras). C: Congestión y aumento de tejido linfoide con presencia de linfocitos lisados (flechas negras). H-E. 400X

A nivel intestinal, se identificaron diversos hallazgos histopatológicos como: necrosis en gran cantidad con un 80% (20/25) del total de muestras, en menor grado se observaron presencia de bacterias 8% (2/25), hiperplasia de enterocitos 8% (2/25), epitelio disgregado 4% (1/25), hiperplasia de células caliciformes 4% (1/25) y presencia de célula granular eosinofílica 4% (1/25) (Cuadro 37).

Cuadro 37. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en intestino de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5	Frecuencia (%)
Necrosis	0	5	5	5	5	80
Bacterias	0	2	0	0	0	8
Hiperplasia de enterocitos	0	1	1	0	0	8
Epitelio disgregado	0	1	0	0	0	4
Hiperplasia de células caliciformes	0	0	1	0	0	4
Célula granular eosinofílica	0	1	0	0	0	4

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La necrosis observada en el intestino se presentó en el 100% de los cuatro grupos experimentales (Fig. 7A), siendo de grado severo en todas las muestras de los grupos G3 y G4 (Cuadro 38).

Cuadro 38. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en intestino en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	0	0	0	0
Escaso	0	2	0	0	0
Leve	0	1	1	0	0
Moderado	0	1	2	0	0
Severo	0	1	2	5	5
Frecuencia (%)	0	100	100	100	100

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de bacterias en intestino sólo se pudo observar en dos muestras del grupo experimental G1, uno en grado leve y otro en grado severo (Cuadro 39).

Cuadro 39. *Frecuencia relativa y absoluta de bacterias en intestino en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	3	5	5	5
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	1	0	0	0
Moderado	0	0	0	0	0
Severo	0	1	0	0	0
Frecuencia (%)	0	40	0	0	0

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La hiperplasia de enterocitos se identificó en dos muestras (Figura 7B), una en grado severo para el grupo experimental G1; y la otra en grado leve para el grupo G2 (Cuadro 40).

Cuadro 40. Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia de enterocitos en los grupos experimentales, 2015

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	4	4	5	5
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	1	0	0
Moderado	0	0	0	0	0
Severo	0	1	0	0	0
Frecuencia (%)	0	20	20	0	0

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Se observó epitelio disgregado en intestino (Figura 7A) de grado severo en sólo una muestra del grupo experimental G1 ( $1 \times 10^4$ ). Además, se observó hiperplasia de células caliciformes (Figura 7B) en una muestra del grupo experimental G2 ( $4 \times 10^4$ ), la cual fue de grado leve. Finalmente, la presencia de células granulares eosinofílicas (Figura 7A) sólo se identificó en una muestra del grupo experimental G1 ( $1 \times 10^4$ ), la cual fue de severa presentación.

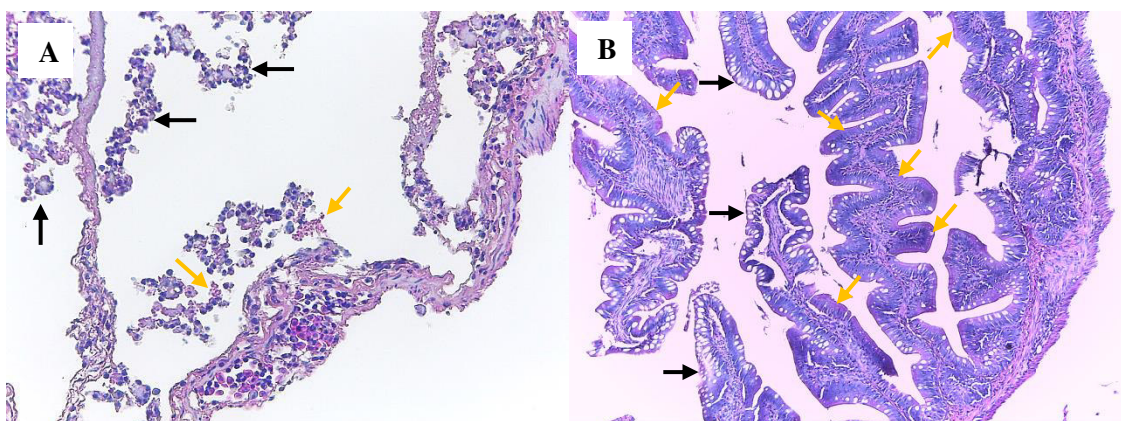


Figura 7. Cortes histológicos de intestino de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*. A: Necrosis con epitelio disgregado (flechas negras) y células granulares eosinofílicas (flechas naranjas). H-E. 400X. B: Hiperplasia de enterocitos (flechas naranjas) con hiperplasia de células caliciformes (flechas negras). H-E. 100X

En las muestras de músculo tomadas de las truchas arcoíris inoculadas experimentalmente se determinaron seis lesiones histopatológicas. La necrosis se presentó en mayor frecuencia con un 44% (11/25) en todos los grupos, en menor frecuencia la presencia de células inflamatorias e infiltración de macrófagos y linfocitos, ambas con 16% (4/25).

Además se identificó la presencia de bacterias en un 12% (3/25), disgregación de fibras musculares 8% (2/25) y dilatación de vasos 4% (1/25) (Cuadro 41).

Cuadro 41. *Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en músculo de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con Y. ruckeri, 2015*

Lesión/ Grupo experimental	Control n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5	Frecuencia (%)
Necrosis	0	4	4	5	5	44
Células inflamatorias	0	1	1	2	0	16
Infiltración de Mac. Y linfocitos	0	0	0	2	2	16
Bacterias	0	0	0	1	2	12
Disgregación de fibras musculares	0	2	0	0	0	8
Dilatación de vasos	0	1	0	0	0	4

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Se observó necrosis muscular (Figura 8A) en los cuatro grupos experimentales inoculados con *Y. ruckeri*, en grado leve a severo. Los grupos G3y G4 presentaron todas sus muestras con severa a moderada intensidad, mientras que los grupos G1 y G2 presentaron el 80% de sus muestras con leve a moderada necrosis (Cuadro 42).

Cuadro 42. *Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en músculo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	1	1	0	1
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	2	3	0	0
Moderado	0	2	1	5	2
Severo	0	0	0	0	3
Frecuencia (%)	0	80	60	100	100

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de células inflamatorias en músculo (Figura 8B) se registró en los grupos G1, G2 y G3, siendo de escasa a moderada intensidad de presentación (Cuadro 43).

Cuadro 43. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de células inflamatorias en músculo en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	4	4	3	5
Escaso	0	1	0	0	0
Leve	0	0	1	0	0
Moderado	0	0	0	2	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	20	20	40	0

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Se identificaron cuatro muestras con infiltración de macrófagos y linfocitos en músculo (Figura 8B) de leve a moderada intensidad de presentación; una de grado leve y otra de grado moderado para el grupo G3, y de la misma manera para el grupo G4 (Cuadro 44).

Cuadro 44. *Frecuencia relativa y absoluta de infiltración de macrófagos y linfocitos en músculo en los grupos experimentales, 2015*

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>G1 n=5</b>	<b>G2 n=5</b>	<b>G3 n=5</b>	<b>G4 n=5</b>
Normal	5	5	5	3	3
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	1	1
Moderado	0	0	0	1	1
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	0	0	40	40

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de bacteria en músculo se pudo identificar en tres muestras, una de escasa intensidad de presentación para el grupo G3, y dos muestras de grado moderado para el grupo G4 (Cuadro 45).

Cuadro 45. *Frecuencia relativa y absoluta de presencia de bacterias en músculo en los grupos experimentales, 2015*

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>G1 n=5</b>	<b>G2 n=5</b>	<b>G3 n=5</b>	<b>G4 n=5</b>
Normal	5	5	5	4	3
Escaso	0	0	0	1	0
Leve	0	0	0	0	0
Moderado	0	0	0	0	2
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	0	0	20	40

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

En el grupo G1 ( $1 \times 10^4$ ) se lograron identificar dos muestras con disgregación de fibras musculares, ambas de leve intensidad de presentación (Figura 8A). Por último, sólo se logró observar una muestra con dilatación de vasos en músculo (Figura 8A) de grado leve en el grupo G1 ( $1 \times 10^4$ ).



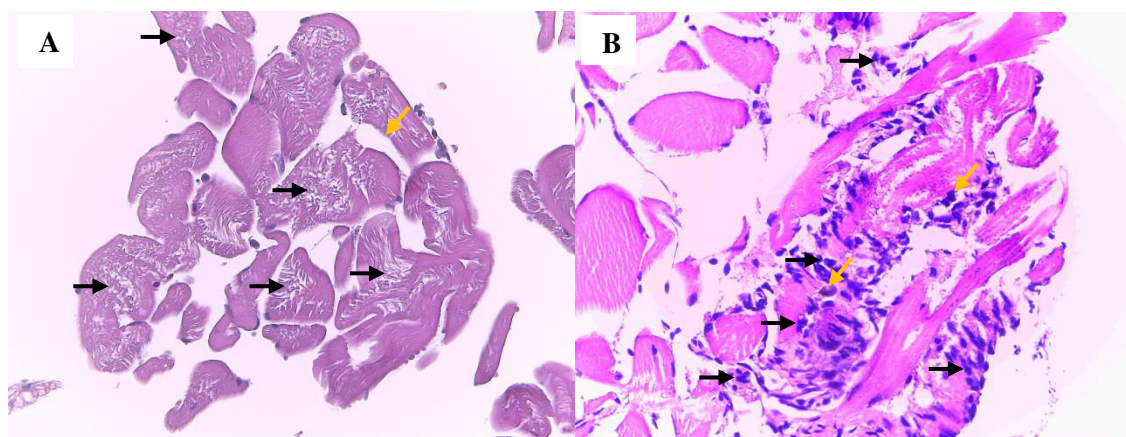


Figura 8. Cortes histológicos de músculo de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*. A: Disgregación de fibras musculares con áreas de necrosis con (flechas negras) y dilatación de vaso sanguíneo (flecha naranja). B: Infiltración de macrófagos (flechas naranjas) y otras células inflamatorias (flechas negras). H-E. 400X

En las branquias se identificaron seis lesiones histopatológicas como hiperplasia y fusión de lamelas en un 52% (13/25) del total de muestras, se observó también congestión 12% (3/25), teleangiectasia 4% (1/25), melanomacrófagos 4% (1/25) e hiperplasia del ápice de lamelas 4% (1/25) (Cuadro 46).

Cuadro 46. Hallazgos histopatológicos y su frecuencia en branquias de truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con *Y. ruckeri*, 2015

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5	Frecuencia (%)
Hiperplasia y fusión de lamelas	0	2	3	3	5	52
Congestión	0	0	1	1	1	12
Teleangiectasia	0	0	0	0	1	4
Presencia de melanomacrófagos	0	1	0	0	0	4
Hiperplasia ápice de lamelas	0	0	0	1	0	4

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Se identificó hiperplasia y fusión de lamelas (Figuras 9A) en diversas muestras de los cuatro grupos inoculados con *Y. ruckeri*, siendo de escaso a moderado grado. El grupo G4 presentó todas las muestras (5/5) con la mencionada lesión histopatológica, predominando una leve intensidad (3/5) de presentación (Cuadro 47).



Cuadro 47. *Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia y fusión de lamelas en branquias en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	3	2	2	0
Escaso	0	0	1	0	1
Leve	0	1	2	1	3
Moderado	0	1	0	2	1
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	40	60	60	100

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

Los grupos G2, G3 y G4 presentaron una muestra cada uno (Cuadro 48) con congestión de branquias en grado leve (Figura 9B).

Cuadro 48. *Frecuencia relativa y absoluta de congestión en branquias en los grupos experimentales, 2015*

Grado/ Grupo experimental	C n=5	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5	G4 n=5
Normal	5	5	4	4	4
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	1	1	1
Moderado	0	0	0	0	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia (%)	0	0	20	20	20

C: Control; G1:  $1 \times 10^4$ ; G2:  $4 \times 10^4$ ; G3:  $1 \times 10^8$ ; G4:  $4 \times 10^8$

La presencia de melanomacrófagos en branquias (Figura 9B) se observó en solo una muestra del grupo G1 de leve intensidad de presentación. Además, sólo una muestra del grupo G4 presentó teleangiectasia en branquias de grado leve (Figura 9A). Finalmente, el grupo G3 fue el único donde se identificó sólo una muestra con hiperplasia de ápice en branquias con escasa intensidad de presentación (Figura 9C).

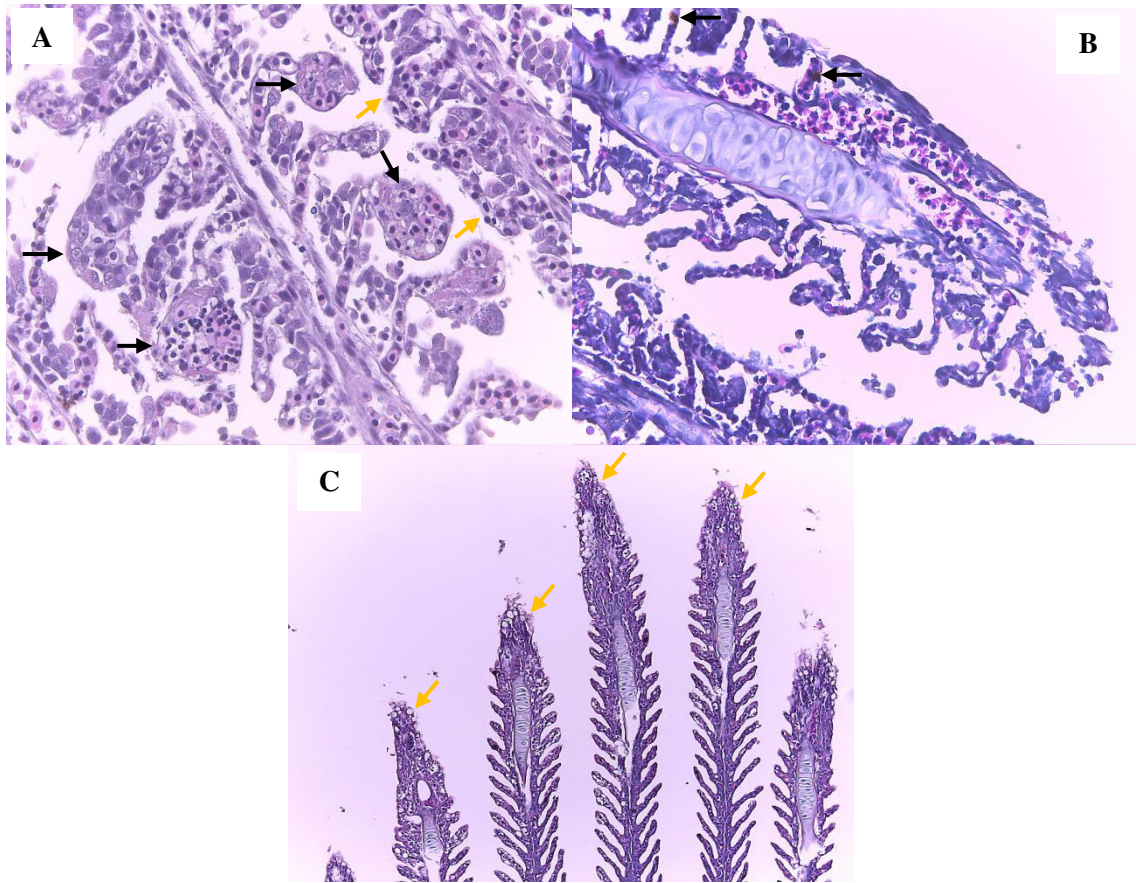


Figura 9. Cortes histológicos de branquias de trucha arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*. A: Hiperplasia y fusión de lamelas (flechas naranjas) con teleangiectasia (flechas negras). B: Congestión con presencia de melanomacrófagos (flechas negras). H-E. 400X. C: Hiperplasia del ápice de las lamelas (flechas naranjas). H-E. 100X.

## V. DISCUSIÓN

La cepa de *Yersinia ruckeri* estudiada en este trabajo mostró una alta patogenicidad en alevines causando septicemias agudas con mortalidades del 50% al segundo día de inoculados en dosis de  $1 \times 10^8$ , demostrando ser la causante de la epizootia de yersiniosis que causó mortalidades, tanto en alevines como en otras etapas de crianza, hasta en 60-70% en pozas de diversas piscigranjas de Huaraz, indicando una patogenicidad inusual en el campo.

Los principales signos clínicos identificados en el presente estudio, tales como anorexia, melanosis, letargo y exoftalmia son signos generales de un pez enfermo y no patognomónico de Yersiniosis. Estos también fueron reportados por diversos autores en retos experimentales con *Y. ruckeri*; sin embargo, no dan mayores datos acerca del tiempo en la aparición de estos signos (Tobback *et al.*, 2009; Mahjoor y Akhlaghi, 2012; Cueva, 2015) y tienen que ver con la patogenicidad de la cepa en estudio. En nuestro caso los signos empezaron a parecer desde las 12 horas post-infección. Por otra parte, se ha reportado que *Y. ruckeri* puede provocar severa afección cerebral (Ohtani *et al.*, 2014) produciendo signos nerviosos como nado errático y en tirabuzón, los cuales fueron encontrados en la presente investigación y por otros autores (Avci y Birincioğlu, 2005). Además, *Y. ruckeri* provoca lesiones edematosas en las glándulas coroidales, con acumulación de líquido intraocular (Busch, 1978), lo que explicaría la exoftalmia encontrada en esta investigación y en otros casos de Yersiniosis. La rápida presentación de estos signos en peces de los grupos G3 y G4, fue más rápida a lo reportado por Seeker *et al.* (2011), quienes describen signos similares pero a partir del tercer día para dosis altas de *Y. ruckeri* inoculadas ( $1 \times 10^8$  y  $4 \times 10^8$ ). En el caso de los grupos G1 y G2, estos signos se presentaron al tercer día de forma y orden similar a los grupos G3 y G4, y a lo reportado por Austin y Austin (2016), quienes observaron la aparición de signos de Yersiniosis al 3<sup>er</sup> o 4<sup>to</sup> día post-infección experimental. Los signos clínicos de Yersiniosis y su temprana aparición en los

grupos G3 y G4, no sólo estaría relacionado a las altas concentraciones inoculadas en los peces, sino también porque esta cepa de *Y. ruckeri* es altamente patógena; lo cual se evidencia en las lesiones que ocasionó. Adicionalmente, esta cepa causó una mortalidad de casi 80% en la piscigranja de donde se aisló, a una temperatura promedio del agua de 15.5 °C, produciendo una rápida presentación en la signología de la Yersiniosis; de manera similar a la forma epidémica de esta enfermedad, observada por Busch (1978), cuando la temperatura del agua está entre 15-18°C.

Todas las truchas arcoíris infectadas con *Yersinia ruckeri*, al examen externo e interno, presentaron lesiones típicas de la Enfermedad de la Boca Roja. Las lesiones que se observaron tanto en los grupos G3 y G4 como en los grupos G1 y G2, con mayor frecuencia, fueron esplenomegalia, contenido mucoso en intestino y congestión intestinal, los cuales también han sido descritos y reportados por Tobback *et al.* (2009), Seeker *et al.* (2011) y Cueva (2015); lo que confirma la patogenicidad *per se* de esta cepa bacteriana a bajas concentraciones. Por otra parte, el 50% de todos los peces inoculados con *Y. ruckeri* presentaron hemorragias alrededor o dentro de la cavidad oral, lo que le da el nombre característico de Boca Roja a esta enfermedad. Avci y Birincioglu (2005) y Cueva (2015) también reportaron no encontrar estas lesiones en todos los peces que inocularon experimentalmente. Entre las lesiones menos frecuentes se identificaron petequias en músculo y tejido graso, palidez hepática y branquial, hemorragia ocular, vejiga natatoria hemorrágica, congestión hepática y petequias en hígado, coincidiendo con las observaciones de Barnes (2011), Sakai *et al.* (2012), Mahjoor y Akhlaghi (2012) y Mateo *et al.* (2016). Estas lesiones estarían asociadas a los factores de virulencia que tiene *Y. ruckeri*, como toxinas extracelulares, adhesinas e invasinas, ruckerbactina, entre otros; tal como lo reportan Fernández *et al.* (2007), Ryckaert *et al.* (2010) y Barnes (2011).

Si bien se obtuvo un 100% de mortalidad en los grupos G3 y G4, las mortalidades también fueron altas en los grupos G1 y G2 con 65% y 60%, respectivamente; a pesar de usar bajas concentraciones de *Y. ruckeri* ( $1 \times 10^4$  y  $4 \times 10^4$ ). Estas dosis fueron menores a la usada ( $5 \times 10^5$ ) por Berc *et al.* (1999) en carpas inoculadas intra-peritonealmente, produciendo una enfermedad septicémica. Las mortalidades comenzaron a los 3 dpi para los grupos G3 y G4, y a los 6 dpi para los grupos G1 y G2. El índice de mortalidad y rapidez de presentación difieren en qué; esto podría deberse por la alta concentración con que fueron inoculados los alevines de truchas arcoíris; sin embargo, se descarta que sea solamente debido que a la alta concentración usada debido que a concentraciones tan bajas como las utilizadas en el presente estudio en los grupos G1 y G2 también produjeron mortalidad con signos clínicos y lesiones, evidenciando la patogenicidad *per se* de esta cepa de *Y. ruckeri* procedente de Huaraz. El retraso en la

manifestaciones clínicas de enfermedad a dosis menores (G1 y G2) y la sobrevivencia de un 35 y 40% de alevines infectados, se deberían a la respuesta inmune de los peces, ya que se ha demostrado que los dos biotipos de *Y. ruckeri* inducen a la producción de TNF- $\alpha$ 1 e IL1- $\beta$ 1 desde el primer día post-desafío con la bacteria, y tienen una máxima expresión de los genes a los 3, 5 y 7 días en el bazo induciendo a una respuesta inmune innata en los peces infectados con bajas dosis. Por otro lado, a altas dosis la expresión de los genes de las proteínas de la superfamilia de TNF son regulados negativamente (down-regulated) a los 3, 5 y 7 días post-infección (Wiens y Vallejo, 2010), siendo esta una de las causas de las altas mortalidades por las dosis altas utilizadas en este trabajo.

En el presente estudio se logró visualizar microscópicamente lesiones en bazo con la presencia de bacterias tanto en el parénquima como en vasos sanguíneos, lo cual prueba la septicemia bacteriana de manera similar a las descritas por Tinsley *et al.* (2011), Mahjoor y Akhlaghi (2012), Sierralta *et al.* (2013). Además, se pudo observar una moderada congestión, necrosis y degeneración grasa, así como la presencia de melanomacrófagos en hígado. Estos hallazgos fueron observados mayormente en los alevines de los grupos G3 y G4, los cuales fueron inoculados con altas concentraciones de *Y. ruckeri*; a diferencia de los otros dos grupos (G1 y G2) inoculados con menor concentración. La degeneración grasa hepática ha sido descrita para animales con infección crónica por *Y. ruckeri* (Avci y Birincioğlu, 2005; Tinsley *et al.*, 2011).

En el caso del riñón, en este estudio se observa regeneración tubular, que ha sido descrita para truchas desafiadas con *Y. ruckeri* también por Tinsley *et al.*, 2011. El incremento de celularidad leucocitaria en riñón también ha sido descrita por Avci y Birincioğlu (2005), asimismo, en otras investigaciones reportan la proliferación de células mononucleares en infecciones crónicas experimentales y en brotes de campo (Tobback, 2007; Mahjoor y Akhlaghi, 2012). Necrosis intestinal con desprendimiento de la mucosa ha sido descrita también por Mahjoor y Akhlaghi (2012) y Sierralta *et al.* (2013). Además, se observó la presencia de bacterias, epitelio disgregado, hiperplasia de células caliciformes, causado por la alta concentración con que fueron inoculados los alevines de truchas arcoíris y por la patogenicidad *per se* que produce esta enterobacteria, asociados a una mayor producción de hemolisinas, proteasas, adhesinas e invasinas, ruckerbactina (Fernández *et al.*, 2007). Adicionalmente, estos hallazgos se correlacionan con las lesiones macroscópicas encontradas, como contenido mucoso en intestino (80%) y congestión intestinal (60%). La patogenicidad de la cepa de *Y. ruckeri* de Huaraz queda demostrada porque se usaron diversas concentraciones de la misma, siendo esta cepa capaz de producir la enfermedad en las truchas arcoíris incluso a concentraciones tan bajas

como  $1 \times 10^4$  y G2:  $4 \times 10^4$ , con mortalidades y lesiones evidentes y similares en las observadas en las diversas concentraciones con que fueron inoculados todos los grupos experimentales (G1, G2, G3 y G4), y también concuerdan con lo descrito y reportado por Sierralta *et al.* (2013), Cueva (2015) y Mateo *et al.* (2016).

La presencia de melanomacrófagos en bajo número en riñón, bazo e hígado, se considera normal en ciertas especies de peces, pero su incremento está asociado a infecciones crónicas (Agius y Roberts, 2003). En nuestro estudio estuvieron presentes en los tejidos mencionados, sin embargo, de manera leve a severa, observándose que se incrementaron su presencia, siendo más severa, en los peces inoculados con una mayor concentración de bacterias, lo cual puede ser explicado debido a que estas células poseen capacidad de fagocitar antígenos, siendo su requerimiento y presencia mayor por el requerimiento de mayor concentración de antígenos, así mismo, esto conlleva además a estimular la respuesta inmune adaptativa (Press y Evensen, 1999), y su incremento ha sido descrito en truchas sobrevivientes a infecciones con *Y. ruckeri* (Tobback *et al.*, 2009; Cueva, 2015).

La vía intramuscular como sitio de inoculación en este y otros estudios experimentales, evidenciaron leve a severa necrosis de las fibras musculares, con presencia de células inflamatorias y bacterias, esta lesión puede ser explicada porque *Y. ruckeri* entre sus factores de virulencia produce una proteasa Yrp1, la cual es capaz de degradar fibronectina, actina y miosina, dañando así las fibras musculares y produciendo además su disgregación (Fernández *et al.*, 2007; Austin y Austin, 2016).

Las lesiones en branquias como congestión, teleangiectasia, hiperplasia y fusión de lamelas así como del ápice lamelar, son similares a las reportadas por la literatura (Berc *et al.*, 1999; Tinsley *et al.*, 2011). Tobback *et al.* (2009) y Ohtani *et al.* (2014), demostrándose que por la vía branquial ocurre una rápida e importante captación de antígenos de *Y. ruckeri*, lo que lleva a suponer que las lesiones observadas son producto de la inoculación de *Y. ruckeri*. Avci y Birincioglu (2005), describieron lesiones branquiales correspondientes a hiperplasia interlamelar en truchas desafiadas contra *Y. ruckeri*, en dicho reporte estas lesiones se consideraron atípicas para la enfermedad y fueron asociadas en cambio, a mala calidad del agua. Para este trabajo, los parámetros físico químicos del agua fueron óptimos para el desarrollo de truchas arcoíris con la excepción de los niveles de amonio-nitrógeno, los cuales se encontraban elevados sin embargo en un rango subletal. Niveles subletales de amonio en agua (2-5 mg/L) provocan hiperemia y fusión de lamelas secundarias en tilapias nilóticas (Benli *et al.*, 2008).

## VI. CONCLUSIONES

- La cepa motil de *Yersinia ruckeri* procedente de Huaraz es altamente patógena, produciendo mortalidad y diversas lesiones en tejidos de truchas arcoíris en condiciones experimentales.
- La cepa de *Y. ruckeri* inoculada experimentalmente a bajas concentraciones producen mortalidades y lesiones anátomo-patológicas en truchas arcoíris como las descritas en infecciones septicémicas naturales, produciendo lesiones hemorrágicas bucales (boca roja) en un 50% de peces infectados, causando mortalidades en un periodo largo de hasta 12 días.
- Altas concentraciones de *Y. ruckeri* ( $1 \times 10^8$ /ml y  $4 \times 10^8$ /ml) producen infecciones septicémicas agudas con altas mortalidades y lesiones en diversos tejidos de truchas arcoíris en un corto periodo (2 a 6 días).

## VII. REFERENCIAS

- Agius C. 1981.** The effects of splenectomy and subsequent starvation on the storage of haemosiderin by the melanomacrophages of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. J of Fish Biol 18: 41–44.
- Agius C, Roberts R. 2003.** Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. J Fish Dis 26: 499-509.
- Alderman D, Hastings T. 1998.** Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. Int J Food Sci Technol 33: 139–155.
- Alfonso A, Lousada S, Silva J, Ellis AE, Silva MT. 1998.** Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. Dis Aquat Organ 34: 27–37.
- Altinok I, Grizzle JM, Liu Z. 2001.** Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. Dis Aquat Organ 44: 29-34.
- Altun S, Onuk EE, Ciftci A, Duman M, Buyukekiz AG. 2013.** Determination of phenotypic, serotypic and genetic diversity and antibiotyping of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout. Kafkas Univ Vet Fak Derg 19: 225–232.
- Aquino G. 2009.** *Manual básico para el cultivo de truchas arcoíris (Oncorhynchus mykiss)*. Oaxaca, México: GEM TIES. 24p.
- Arias CR, Olivares-Fuster O, Hayden K, Shoemaker CA, Grizzle JM, Klesius PH. 2007.** First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the USA. J Aquat Anim Health 19: 35-40.
- Austin DA, Robertson PA, Austin B. 2003.** Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Syst Appl Microbiol 26: 127-131.
- Austin B, Austin DA. 2016.** Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. 6<sup>th</sup> ed. Suiza: Springer International. 761 p.
- Avci H, Birincioglu SS. 2005.** Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 29: 1321-1328.
- Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Muzquiz JL, Girones O. 2008.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278: 188–191.



- Barnes AC. 2011.** Enteric red mouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Woo P, Bruno D (eds). Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. 2<sup>nd</sup> ed. UK: CABI. p 484–511.
- Bastardo A, Sierralta V, León J, Ravelo C, Romalde JL. 2011.** Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture* 317: 229-232.
- Benli ACK, Köksal G, Özku A. 2008.** Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere* 72: 1355-1358.
- Berc A, Petrinc Z, Matasin Z, Kosaric Z. 1999.** *Yersinia ruckeri* septicaemia in experimentally infected carp (*Cyprinus carpio* L) fingerlings. *Acta Vet Hung* 47: 161-172.
- Bourne DG, Garren M, Work TM, Rosenberg E, Smith GW, Harvell CD. 2009.** Microbial disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol* 17: 554-562.
- Bravo S, Kojagura V. 2004.** First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 24(2): 104-108.
- Buchmann K, Nielsen ME, Nielsen CV. 2003.** Immune responses against *Yersinia ruckeri* have no effect on colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by *Gyrodactylus derjavini* (Mikailov, 1975). *J Fish Dis* 26: 183-186.
- Bueno Ch. 2012.** Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas de *Oncorhynchus mykiss* del centro piscícola “El ingenio”– Huancayo. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 86 p.
- Bullen JJ. 1987.** Iron and the antibacterial function of polymorphonuclear leukocytes. In: Bullen JJ, Griffiths E, eds. *Iron and Infection*. 1<sup>st</sup> ed. UK: John Wiley, p 211-241.
- Bullock GL, Stuckey HM, Shotts EB. 1978.** Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. *Journal of Fish Diseases* 1: 351-356.
- Busch RA, Lingg AJ. 1975.** Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can* 32: 2429–2432.
- Busch RA. 1978.** Enteric redmouth disease (Hagerman strain). *Mar Fish Rev* 40: 42–51.
- Capkin E, Altinok I. 2009.** Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *J Appl Microbiol* 106: 1147-1153.
- Canadian Council on Animal Care- CCAC. 2010.** CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. 1<sup>st</sup> ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 36 p.

- Cipriano RC, Schill WB, Pyle SW, Horner R. 1986.** An epizootic in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by a sorbitol-positive serovar 2 strain of *Yersinia ruckeri*. J Wildl Dis 22: 488-492.
- Coquet L, Quillet L, Petit F, Junter G, Jouenne T. 2002.** Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm. Appl Environ Microbiol 68: 470-475.
- Cossarini-Dunier M, Demael A, Lepot D, Guerin V. 1988.** Effect of manganese ions on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) against *Yersinia ruckeri*. Dev Comp Immunol 12: 573-579.
- Costa AA, Leef MJ, Bridle AR, Carson J, Nowak BF. 2011.** Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 315: 201–206.
- Cueva A. 2015.** Eficacia de dos métodos de administración de una vacuna contra *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis de médico veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 93 p.
- Cutrin JM, Conchas RF, Barja JL, Toranzo AE. 1994.** Electrotransformation of *Yersinia ruckeri* by plasmid DNA. Microbiologia 10: 69-82.
- Dahiya I, Stevenson R. 2010.** *Yersinia ruckeri* genes that attenuate survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are identified using signature-tagged mutants. Vet Microbiol 144: 399-404.
- Daly JG, Lindvik B, Stevenson RMW. 1986.** Serological heterogeneity of recent isolates of *Yersinia ruckeri* from Ontario and British Columbia. Dis Aquat. Org 1: 151-153.
- Davies RL. 1991.** Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. Vet Microbiol 29: 289-297.
- De Grandis SA, Stevenson R. 1982.** Variations in plasmid profiles and growth-characteristics of *Yersinia ruckeri* strains. FEMS Microbiology Letters 15 (3): 199-202.
- De Grandis SA, Stevenson R. 1985.** Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Antimicrob Agents Chemother 27: 938-942.
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. 2007.** Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. Trends Biotechnol 25: 472–479.

- Del cerro A, Marquez I, Guijarro JA. 2002.** Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 68: 5177-5180.
- Deshmukh S, Raida MK, Dalsgaard I, Chettri JK, Kania PW, Buchmann K. 2012.** Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol* 145: 379–385.
- Eschmeyer W. 2007.** Catalog of fishes-fishbase. California academy of Sciences: Department of Ichthyology. [Internet]. Disponible en: <http://www.fishbase.org/summary/Oncorhynchus-mykiss.html>
- Evenhuis JP, Cleveland BM. 2012.** Modulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal immune gene expression following bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol* 146: 8–17.
- FAO. 2016.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Roma: FAO. 224 p.
- FAO. 2017.** Fishery and Aquaculture Statistics. Global aquaculture production 1950-2016 (FishstatJ). Roma: FAO Fisheries and Aquaculture Department [Internet]. Disponible en: [www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en](http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en)
- FAO. 2017.** Programa de información de especies acuáticas. Roma: FAO [Internet]. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus\\_mykiss/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es)
- Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR. 1985.** Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 21: 46–76.
- Fernández L, Secades P, Lopez J, Márquez I, Guijarro J. 2002.** Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence. *Microbiology* 2002 (148): 2233–2243.
- Fernández L, López JR, Secades P, Menéndez A, Márquez I, Guijarro JA. 2003.** In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl Environ Microbiol* 69 (12): 7328-7335.
- Fernández L, Márquez I, Guijarro JA. 2004.** Identification of specific in vivo-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl Environ Microbiol* 70: 5199-5207.
- Fernández L, Méndez J, Guijarro JA. 2007a.** Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Vet Microbiol* 125: 1-10.

- Fernández L, Prieto M, Guijarro JA. 2007b.** The iron- and temperature-regulated haemolysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*. Microbiology 153: 483-489.
- Fernández C. 2011.** Determinación de *Yersinia Ruckeri* y sus características lesionales anátomo-histopatológicas en truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa pre-comercial en una piscigranja de la región Junín. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 69 p.
- Flores K. 2013.** Determinación de la diversidad fenotípica de *Yersinia ruckeri* en aislados de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de las regiones de Junín, Ancash y Huancavelica. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 83 p.
- Fondo nacional de desarrollo pesquero- FONDEPES. 2014.** Manual de crianza de truchas en ambientes convencionales. 1ª ed. Lima: EINS Perú. 88 p.
- Fouz B, Zarza C, Amaro C. 2006.** First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. J Fish Dis 29: 339-346.
- García J, Dominguez L, Larsen J, Pedersen K. 1998.** Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*. J Appl Microbiol 85: 949-955.
- Gibello A, Blanco MM, Moreno MA, Cutuli MT, Domenech A, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. 1999.** Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. Applied and environmental microbiology 65: 346–350.
- Gibello A, Porrero M, Blanco M, Vela A, Liebana P, Moreno M, Fernandez J, Dominguez L. 2004.** Analysis of the *gyrA* gene of clinical *Yersinia ruckeri* isolates with reduced susceptibility to quinolones. Appl Environ Microbiol 70: 599-602.
- Glenn RA, Taylor PW, Pelton EH, Gutenberger SK, Ahrens MA, Marchant LM, Hanson KC. 2014.** Genetic evidence of vertical transmission and cycling of *Yersinia ruckeri* in hatchery-origin fall chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. J Fish Wild Manage 5: 197-201.
- Gunasena D, Komrower J, Macyntyre S. 2003.** The fish pathogen *Yersinia ruckeri* possesses a TTS system. Adv Exp Med Biol 529: 105-117.
- Huang Y, Michael G, Becker R, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S, Runge M, Steinhagen D. 2013.** Pheno- and genotypic analysis of antimicrobial resistance properties of *Yersinia ruckeri* from fish. Vet Microbiol 2013 (9): 215-224.

- Ingerslev HC, Strube ML, Jørgensen LVG, Dalsgaard I, Boye M, Madsen L. 2014.** Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 40: 624–633.
- Irianto A, Austin B. 2002.** Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis* 25: 633–642.
- Ispir U, Dorucu M. 2010.** Effect of immersion booster vaccination with *Yersinia ruckeri* extracellular products (ECP) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Int Aquat Res* 2: 127–130.
- Kania PW, Chettri JK, Buchmann K. 2014.** Characterization of serum amyloid A (SAA) in rainbow trout using a new monoclonal antibody. *Fish Shellfish Immunol* 40: 648–658.
- Kim DH, Austin B. 2006.** Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 21: 513–524.
- Kranz H. 1989.** Changes in splenic melano-macrophage centres of dab, *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Dis Aquat Org* 6: 167–173.
- Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research* 46: 2-6.
- Kuramoto J. 2008.** Integración de los pequeños productores de trucha con los mercados externos: ¿una meta lejana?. *Economía y Sociedad (CIES)* 69: 40-45.
- López J. 2012.** Identificación de biotipos de *Yersinia ruckeri* aisladas en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa juvenil procedentes de dos piscigranjas de la región Junín. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Lucangeli C, Morabito S, Caprioli A, Achene L, Busani L, Mazzolini E. 2000.** Molecular fingerprinting of strains of *Yersinia ruckeri* serovar O1 and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated in Italy. *Vet Microbiol* 76: 273-281.
- Luna R, Castillo C, Sierralta A, Van Ordt G, Velásquez V. 2005.** Plan de negocios para la producción y exportación de filetes congelados de tilapia roja mercado estadounidense. Tesis de maestría. Lima: Universidad ESAN. 3 p.
- Mahjorr AA, Akhlaghi M. 2012.** A pathological study of rainbow trout organs naturally infected with enteric redmouth disease. *Asian Journal of Animal Sciences* 6: 147-153.
- Mateo E, Castro T, Sierralta V and Mateo DR. 2016.** Bacteriological and histopathological study of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Peru. *Journal of Fish Diseases* 40 [Internet]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfd.12555>

- Mendez J, Fernandez L, Menendez A, Reimundo P, Perez-Pascual D, Navais R, Guijarro JA. 2009.** A chromosomally-located traH-N operon encoding a putative type IV secretion system is involved in the virulence of *Yersinia ruckeri*. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (4): 937-945.
- Mendez J, Reimundo P, Perez-Pascual D, Navais R, Gomez E, Guijarro J. 2010.** A novel cdsAB operon is involved in the uptake of L-cysteine and participates in the pathogenesis of *Yersinia ruckeri*. *J Bacteriol* 193: 944-951.
- Mendoza D. 2011.** Estudio sobre la acuicultura de la trucha a nivel mundial, el desenvolvimiento de la importación de Ovas, la tendencia de la producción nacional y su comercialización. Perú: Dirección General de Acuicultura- Ministerio de la Producción. 34 p.
- Meyers TR. 2009.** Standard Necropsy Procedures for Finfish. In: Heil N, ed. NWFHS Laboratory Procedures Manual. 5<sup>th</sup> ed. Washington: US Fish and Wildlife Service. p 64-74.
- Michel C, Kerouault B, Martin C. 2003.** Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: Comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *J Appl Microbiol* 95: 1008–1015.
- Mydlarz L, Couch C, Weil E, Smith G, Harvell C. 2009.** Immune defenses of healthy, bleached and diseased *Montastraea faveolata* during a natural bleaching event. *Dis Aquat Organ* 87: 67-78.
- Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. 2011.** Mecanismos moleculares de Resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 28 (4): 648-656.
- Navais R, Mendez J, Reimundo P, Perez-Pascual D, Gomez E, Guijarro J. 2010.** The yctCBA operon of *Yersinia ruckeri* involved in *in vivo* citrate uptake is not necessary for virulence. *Appl Environ Microbiol* 77: 1107-1110.
- Noga E, Levine J, Townsend K, Bullis R, Carlson C, Corbett W. 1988.** Kidney biopsy: a nonlethal method for diagnosing *Yersinia ruckeri* infection (enteric red mouth disease) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Am J Vet Res* 49: 363-365.
- O’Leary PJ. 1977.** Enteric redmouth of salmonids: a biochemical and serological comparison of selected isolates. Tesis de maestría. Oregon: Oregon State University. 78 p.

- O'Toole GA, Kolter R. 1998.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295–304.
- Ohtani M, Villumsen KR, Strøm HK, Raida MK. 2014.** 3D Visualization of the initial *Yersinia ruckeri* infection route in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by optical projection tomography. *PLoS One* 9: 1-10.
- Paulson L, Martin P, Persson A, Nilsson CL, Ljung E, Westman-Brinkmalm A, Eriksson PS, Blennow K, Davidsson P. 2003.** Comparative genome and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats. *J Neurosci* 71: 526–533.
- Pérez HJ, Robles A. 2013.** Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista médica MD* 4 (3): 186-191.
- Pratt LA, Kolter R. 1998.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30: 285–293.
- Press CM, Evensen O. 1999.** The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol* 9: 309–318.
- PRODUCE. 2008.** La actividad de acuicultura en el Perú. Lima: Ministerio de la Producción [Internet]. Disponible en: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/boletines/DESCRIPCION%20DE%20LA%20ACTIVIDAD%20ACUICOLA.pdf>
- PRODUCE. 2009.** Especies cultivadas en el Perú. Lima: Ministerio de la Producción [Internet]. Disponible en: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/boletines/FICHAS%20PRINCIPALES%20ESPECIES.pdf>
- PRODUCE. 2015.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2015. Lima: PRODUCE. Informes anual estadístico. 196 p.
- PROMPERÚ. 2016.** Desarrollo del comercio exterior pesquero. Perú: Coordinación General de Pesca y Acuicultura. Informe anual estadístico. 95 p.
- RAGASH- Municipalidad distrital Ragash. 2009.** Manual de Crianza- Trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Perú: Municipalidad distrital de Ragash. Manual. 25 p.
- Raida M, Larsen J, Nielsen M, Buchmann K. 2003.** Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (BioPlus2B). *J Fish Dis* 26: 495-498.
- Raida M, Buchmann K. 2008.** Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine* 26: 1050–1062.

- Raida M, Buchmann K. 2009.** Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. Dev Comp Immunol 33: 35-45.
- Raida MK, Nylén J, Holten-Andersen L, Buchmann K. 2011.** Association between plasma antibody response and protection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. PLoS One 6: e18832.
- Reimschuessel R, Bennett RO, Lipsky M. 1992.** Communications: a classification system for histological lesions. J Aquat Anim Health 4: 135-143.
- Robertson PAW, O'Dowd C, Burrells C, Williams P, Austin B. 2000.** Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture 185: 235–243.
- Rodgers CJ. 1992.** Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. J Fish Dis 15: 243-254.
- Rodgers C. 2001.** Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. Aquaculture 196: 325–345.
- Romalde J, Toranzo A. 1993a.** Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the redmouth diseases. Bull Eur Ass Fish Pathol 11: 147-150.
- Romalde J, Toranzo A. 1993b.** Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. FEMS Microbiol Lett 112: 291-299.
- Romalde JL, Magarinos B, Pazos F, Silva A, Toranzo AE. 1994.** Incidence of *Yersinia ruckeri* in 2 farms in Galicia (NW Spain) during a one-year period. Journal of Fish Diseases 17 (5): 533-539.
- Ross AJ, Rucker RR, Ewing WH. 1966.** Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Microbiology 12: 763-770.
- Ross LG, Ross B. 2008.** Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Blackwell Science. 228 p.
- Rubio M, Cabrera A, Coffigny R, Aguilera Y. 2010.** Bacterial variability in during the rainy and dry seasons cultured in freshwater environment in different regions of Cuba. Revista electrónica de Veterinaria Vol. 11 [Internet]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070710/071019.pdf>
- Rucker R. 1966.** Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin de L'Office International des Epizooties 65: 825-830.



- Ryckaert J, Bossier P, D'herde K, Diez-Fraile A, Sorgeloos P, Haesebrouck F, Pasmans F. 2010.** Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 29: 648-655.
- Sakai T, Nakayasu C, Ito T, Miwa S, Oseko N, Iida T. 2012.** Virulence of *Yersinia ruckeri* for four indigenous fish species in Japan. *Fish Pathology* 47 (2): 74-79.
- Sandoval N, Llanco L, Manchego A, Mesías F. 2016.** Determinación de *Yersinia ruckeri* y susceptibilidad antimicrobiana en alevines de truchas arcoíris cultivadas en el lago Titicaca- Puno. En: LACQUA - SARA 2016. Lima: World Aquaculture Society.
- Şeker E, Karahan M. 2011.** Detection of *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction (PCR) in infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Animal & Plant Sciences* 21: 570-574.
- Sica MG, Brugnoli LI, Marucci PL, Cubitto MA. 2012.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101: 869–879.
- Sierralta V. 2011.** Estado situacional de *Yersinia ruckeri* causante de “la enfermedad entérica de la boca roja” en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) en piscigranjas de la sierra central del Perú. Tesis de maestría. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 78 p.
- Sierralta V, León J, De Blas I, Bastardo A, Romalde J, Castro T, Mateo E. 2013.** Patología e identificación de *Yersinia ruckeri* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscigranjas de Junín, Perú. *Revis AquaTIC* 38: 28-45.
- Sirvas S, Sánchez C, Peña C. 2011.** Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. *Rev Perú biol* 18 (3): 349 – 353.
- Siwicki A, Morand M, Fuller J, Nissen S, Kazun K, Glomski E. 2001.** Influence of HMB (beta-hydroxy-beta-methylbutyrate) on antibody secreting cells (ASC) after in vitro and in vivo immunization with the anti-*Yersinia ruckeri* vaccine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Res* 32: 491-498.
- Soltani M, Shafiei S, Yosefi P, Mosavi S, Mokhtari A. 2014.** Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 37: 60–65.
- Soto D, Aguilar-Manjarrez J, Brugère C, Angel D, Bailey C, Black K. 2008.** Applying an ecosystem-based approach to aquaculture: principles, scales and some management measures. *FAO Fisheries Proceedings* 14: 15–35.

- Sousa JA, Magariños B, Eiras JC, Toranzo AE, y Romalde JL. 2001.** Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems. *J Fish Dis* 24: 151-159.
- Starliper C. 2008.** General and specialized media routinely employed for primary isolation of bacterial pathogens of fishes. *J Wild Dis* 44: 121-132.
- Stave JW, Cook TM, Roberson BS. 1987.** Chemiluminescent responses of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), phagocytes to strains of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 10 (1): 1-10.
- Stevenson R, Airdrie, D. 1984.** Isolation of *Yersinia ruckeri* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol* 47: 1201-1205.
- Stock I, Henrichfreise B, Wiedemann B. 2002.** Natural antibiotic susceptibility and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. aldovae* and *Y. Ruckeri*. *J Med Microbiol* 51: 56-69.
- Strom H K, Ohtani M, Nowak B, Boutrup TS, Jones B, Raida MK, Bojesen AM. 2017.** Experimental infection by *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 induces brain lesions and neurological signs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Diseases* 2017: 1-9.
- Temprano A, Riano J, Yugueros J, Gonzalez P, de Castro L, Villena A, Luengo JM, Naharro G. 2005.** Potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic aroA mutant as a live attenuated vaccine. *J Fish Dis* 28: 419-427.
- Thorsen B, Enger O, Norland S, Hoff K. 1992.** Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. *Appl Environ Microbiol* 58: 1624-1628.
- Tinsley J, Lyndon A, Austin B. 2011.** Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J App Microbiology* 111: 8-16.
- Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesesbrouck F, Chiers K. 2007.** *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J Fish Dis* 30: 257-268.
- Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesesbrouck F, Chiers K. 2009.** Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* 84: 219-28.
- Tobback E, Decostere A, Hermans K, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010a.** In vitro markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. *J Fish Dis* 33: 197-209.
- Tobback E, Hermans K, Decostere A, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010b.** Interactions of virulent and avirulent *Yersinia ruckeri* strains with isolated

- gill arches and intestinal explants of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ 90: 175-179.
- Trosky JE, Liverman AD, Orth K. 2008.** *Yersinia* outer proteins: Yops. Cellular Microbiology 10 (3): 557-565.
- Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso ML, Rasko DA, Mammel MK, Eppinger M, Rosovitz MJ, Wagner D, Rahalison L, LeClerc JE, Hinshaw JM, Lindler LE, Cebula TA, Carniel E, Ravel J. 2007.** Multiple antimicrobial resistances in plague: an emerging public health risk. PlosOne ed. 309 [Internet]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0000309&type=printable>
- Wheeler R, Davies R, Dalsgaard I, Garcia J, Welch T, Wagley S, Bateman K, Verner-Jeffreys D. 2009.** *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. Dis Aquat Organ 84: 25-33.
- Wiens G, Glenney G, Lapatra S, Welch T. 2006.** Identification of novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) chemokines, CXCD1 and CXCD2: mRNA expression after *Yersinia ruckeri* vaccination and challenge. Immunogenetics 58: 308-323.
- Wiens G, Vallejo R. 2010.** Temporal and pathogen-load dependent changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response traits following challenge with biotype 2 *Yersinia ruckeri*. Fish Shellfish Immunol 29: 639-647.
- Willumsen B. 1989.** Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. J Fish Dis 12: 275-277.
- Wrobel A, Ottoni C, Leo J, Gulla S, Linke D. 2017.** The repeat structure of two paralogous genes, *Yersinia ruckeri* invasin (yrInv) and a “*Y. ruckeri* invasin-like molecule” , (yrIlm) sheds light on the evolution of adhesive capacities of a fish pathogen. Journal of Structural Biology 17: 1-13.

## VIII. ANEXOS

### Anexo N° 1: Protocolo de PCR convencional

Los procedimientos se realizarán con mandil, mascarilla, guantes y lentes protectores.

Preparaciones previas:

- Tener un contenedor con hielo para mantener la temperatura de los reactivos utilizados.
- El ADN de *Y. ruckeri* a amplificar deberá estar a una concentración de 50 ng/μl.
- Mix de PCR: este debe prepararse en un tubo de microcentrífuga de 2ml de capacidad.

Composición del Mix de PCR (a un volumen final de 23 μl por muestra):

GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5 μl	}	x N
Forward primer Yer8	2 μl (10 μM conc. Final)		
Reverse primer Yer10	2 μl (10 μM conc. Final)		
Agua libre de nucleasas	6.5 μl		
<i>Y. ruckeri</i> ADN	2 μl		

\*N: número de muestras a trabajar.

#### PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 18 μl de Mix de PCR en microtubos para PCR.
2. Agregar 2 μl de ADN de la muestra y pipetear para mezclar bien.
3. Tapar los tubos debidamente para evitar evaporación.
4. Llevar los tubos al termociclador.
5. Programar el termociclador con el siguiente protocolo (Del Cerro *et al.*, 2002):

N° de ciclos	Temp. (°C)	Tiempo (min)
1	94	2
40	94	40 seg
	60	40 seg
	72	1
1	72	10

6. Al finalizar, los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis, utilizando gel de agarosa (1.5%) en buffer TBE 1X, sometidos a campo eléctrico de 90 V/cm durante 60 minutos. Por último, se tiñeron con 0.5 μg/ml de bromuro de etidio, dando un tamaño aprox. de 575 pb.

## **Anexo N° 2: Procesamiento de las muestras para histopatología**

### **A. Fijación**

Ni bien fueron obtenidas, las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10% para conservar la estructura morfológica y química de las células y tejidos.

### **B. Deshidratación**

Se realiza con el objetivo de eliminar el agua intra y extracelular para lo cual los tejidos son deshidratados sumergiéndolos en líquidos anhidros, ávidos de agua. Se utilizaron alcoholes de distintas concentraciones:

- Alcohol etílico al 70 por 100 por 1 hora.
- Alcohol etílico al 80 por 100 por 1 hora.
- Alcohol etílico al 95 por 100 por 1 hora.
- Alcohol etílico al 100 por 100 por 1 hora.
- Alcohol etílico al 100 por 100 por 1 hora.
- Alcohol etílico al 100 por 100 por 1 hora.

### **C. Aclaración**

Este procedimiento permite que el alcohol de los tejidos sea reemplazado por un líquido que disuelva la parafina con la cual el tejido va a ser impregnado y tiene la propiedad de volver transparentes a las muestras, para ello se utilizó inmersiones en xileno según el siguiente proceso:

- Xileno 1: 1 hora
- Xileno 2: 1 hora
- Xileno 3: 1 hora

### **D. Inclusión**

Este proceso comprende la impregnación de las muestras con un medio que llene todas las cavidades naturales, espacios e intersticios tisulares y aun los espacios intracelulares, proporcionando consistencia firme, necesaria para realizar los cortes sin provocar distorsión. Permite encerrarlos en un bloque de parafina que facilita el manejo y fijación de la muestra

al micrótopo sin dañarla, para ello se utilizó inmersiones en parafina según el siguiente proceso:

- Parafina líquida I: 1 hora
- Parafina líquida II: 2 horas

Posteriormente cada una de las muestras fue colocada en el centro de un molde con parafina líquida y se dejó reposar al medio ambiente hasta que solidifique.

#### **E. Corte**

Para el corte de las muestras se utilizó un micrótopo de deslizamiento verificando que esté ajustado para el grosor de 5-6µm, se colocó el bloque de parafina conteniendo la muestra y se comenzó el corte con impulsos regulares. Luego se retomaron las láminas de parafina cortadas con el micrótopo conteniendo las muestras y se hizo flotar en un recipiente de agua a temperatura ambiente para quitar el excedente de parafina, se introdujo al recipiente una laminilla, se colocó la muestra en ella y se levantó suavemente con un movimiento uniforme y al tocar el borde de la muestra, esta se adhirió a ella, dejándose escurrir la laminilla con la muestra impregnada a un ángulo de 60° durante dos a cinco minutos.

#### **F. Secado de cortes**

Una vez los cortes de las muestras se colocaron en una estufa a temperaturas de 37°C a 40°C durante toda la noche. El secado permite que desaparezca toda huella de agua entre el corte y el portaobjetos.

#### **G. Tinción de cortes**

Se utilizó la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E) que son colorantes de contraste. La hematoxilina permite observar las estructuras basófilas y la eosina las estructuras acidófilas.

Primero se sumergieron los cortes en baño con xileno I durante tres minutos, luego se pasaron a baño en xileno II por dos minutos, se dejó escurrir el exceso de solución inclinando el soporte y dejándolo en contacto con el borde del recipiente. Luego se sometieron a un primer baño en alcohol etílico absoluto durante dos minutos. Posteriormente se sumergieron en alcohol etílico 95° durante dos minutos. Sucesivamente se sumergieron en alcohol de 70° por uno a dos minutos. Una vez realizados los baños con alcohol se hidrataron los cortes sumergiéndolos en agua destilada por uno a dos minutos.

Luego se realizó la tinción durante 5 minutos con hematoxilina. Sucesivamente se aclaró sumergiendo la preparación tres veces en alcohol ácido al 1 por 100. Para finalmente enjuagar con agua. Se colocaron las muestras en caronato de litio al 1 por 100 por 30 segundos y se enjuagó con agua. Se procedió a teñir con eosina durante 30 segundos y se enjuagó rápidamente con alcohol al 80 por 100. Se lavó con agua por 30 segundos. Se procedió a deshidratar en tres baños sucesivos de alcohol etílico absoluto de 20 segundos cada uno. Se pasó por tres baños de xileno de 15 segundos cada uno. Finalmente se procedió a montar la preparación con bálsamo de Canadá y se colocó una lámina cubreobjetos.

**Anexo N° 3: Fotos de signos clínicos, lesiones externas e internas en truchas arcoíris  
inoculadas con *Yersinia ruckeri***



**Foto 1.** Truchas con nado errático, orillamiento y letargia



**Foto 2.** Truchas con letargia y melanosis

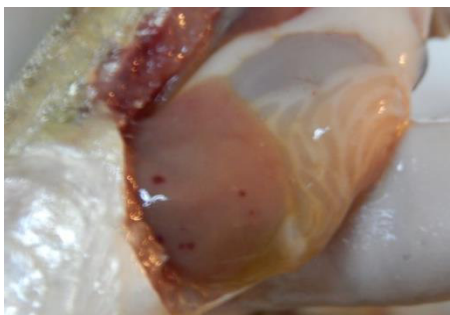


**Foto 3.** Trucha con abdomen abultado y melanosis





**Foto 4.** Trucha con melanosis y exoftalmia



**Foto 5.** Trucha con petequias en hígado e intestino abultado



**Foto 6.** Trucha con hemorragia en ojo, esplenomegalia y petequias en intestino



**Foto 7.** Trucha con hemorragia en boca y ligera exoftalmia